

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
MARC CHARLAND
M. Sc. (Biophysique)

MESURE DE L'ACTIVITÉ DES PHOTOSYSTÈMES I ET II
IN VIVO EN SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE:
EFFETS DES VARIATIONS DE L'ENVIRONNEMENT LUMINEUX
SUR L'ACTIVITÉ PHOTOSYNTHÉTIQUE

MARS 1993

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A Marie-Hélène
et Emilie,
avec affection...

*Il est souvent plus intéressant d'observer les
premiers pas chancelants d'un enfant que de
regarder la démarche assurée d'un adulte; et
je sens que nos premiers pas dans ce nouveau
champ d'investigations de la science pourront
vous sembler plus intéressants que les résul-
tats complets d'une recherche mature...*

Alexander G. Bell

RÉSUMÉ

L'absorption d'énergie lumineuse régit le fonctionnement de la photosynthèse mais, paradoxalement, la lumière constitue le facteur abiotique le plus variable, autant en intensité qu'en qualité. Dans le cadre de ce travail, je me suis particulièrement intéressé aux effets de la variation spectrale de la lumière incidente, ainsi que ceux induits par de hautes intensités lumineuses sur l'appareil photosynthétique de plants d'érable à sucre et de bleuetier. Mes travaux visent ultimement à étudier *in vivo* l'activité photosynthétique des photosystèmes I et II grâce à la spectroscopie photoacoustique, lors des variations de l'environnement lumineux, autant qualitatives que quantitatives.

Le premier chapitre vise à introduire les concepts reliés à la photosynthèse et aux effets de la lumière incidente sur celle-ci. Le second chapitre comprend la théorie sous-jacente à l'application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la photosynthèse, ainsi qu'une revue bibliographique de cette méthodologie. Quant au troisième chapitre, il comprend la description du matériel utilisé et la méthodologie employée au cours des mesures expérimentales.

La première section expérimentale de mon travail (chapitre 4) porte sur la caractérisation du signal photoacoustique chez les feuilles. Je démontre que le signal photoacoustique d'O₂ s'avère une résultante de différents mécanismes, autant photochimiques que biochimiques, qui affectent la génération et la propagation de celui-ci dans

la feuille. Dans un deuxième temps, l'effet de l'infiltration d'eau sur le signal photoacoustique et sur l'activité photosynthétique de feuilles est analysé. En anihilant le signal photoacoustique d'O₂, l'infiltration permet la collecte de données plus précises d'emmagasinement d'énergie photosynthétique, un paramètre fort important de la méthodologie photoacoustique, sans pour autant affecter l'activité photosynthétique. L'infiltration d'eau permet également d'augmenter la résolution spectrale de la méthodologie photoacoustique. Ce chapitre présente le risque de travailler avec le signal photoacoustique d'oxygène comme seul indicateur de l'activité photosynthétique, tout en ouvrant la voie à l'emploi de feuilles infiltrées afin d'utiliser un second paramètre photoacoustique, l'emmagasinement d'énergie photosynthétique, dans de meilleures conditions expérimentales qu'usuellement.

Un objectif majeur de ce travail consiste en la détermination de l'activité photosynthétique *in vivo* des photosystèmes I et II, ensemble ou séparément, à l'aide d'un paramètre expérimental commun de la spectroscopie photoacoustique. La méthodologie développée est présentée au chapitre 5 et fait appel à l'emmagasinement d'énergie photosynthétique. L'utilisation d'un faisceau de haute intensité dans le domaine du rouge lointain ($\lambda > 715$ nm) sature l'activité du photosystème I, ce qui nous permet d'évaluer la contribution de l'emmagasinement d'énergie photosynthétique de celui-ci ($EEP_{PS\ I}$) par rapport à la quantité d'énergie totale absorbée par la feuille. La valeur de l'emmagasinement d'énergie photosynthétique du photosystème II est établie par la diffé-

rence entre l'EEP_{PS I} et l'emmagasinage d'énergie photosynthétique total des deux photosystèmes (effectué grâce à l'emploi du faisceau saturant blanc). Des variations des emmagasinages d'énergie photosynthétique des deux photosystèmes se produisent lors des transitions d'état, ce qui permet l'établissement d'un nouvel indicateur photoacoustique de ce phénomène; dans ce cas, la mesure se révèle directe. Finalement, une étude de l'activité photosynthétique des deux photosystèmes à l'intérieur du domaine de la radiation photosynthétiquement active est présentée, et les résultats comparés à des mesures antérieures. Cette méthodologie s'avère donc fort utile en vue de caractériser l'activité des deux photosystèmes, lors des variations qualitatives de l'environnement lumineux.

En utilisant l'approche expérimentale développée au chapitre 5, j'étudie au chapitre 6 l'effet d'un stress photoinhibiteur sur l'activité photosynthétique. Lors d'un stress de hautes intensités lumineuses ($1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, 1 h), le photosystème II se révèle spécifiquement inhibé, alors que l'activité du photosystème I s'avère augmentée. Cette hausse de l'activité du photosystème I se traduit par des élévations du transport cyclique d'électrons autour du photosystème I, et de l'activité linéaire, dépendante du photosystème II. Des intensités lumineuses supérieures inhibent partiellement l'activité du photosystème I. Les feuilles d'ombre des plants d'érable à sucre et de bleuetier sont plus sensibles au stress photoinhibiteur. Le bleuetier, une espèce pionnière, ne présente pas de résistance particulière à la photoinhibition.

En conclusion, le présent travail démontre le potentiel que possède la méthodologie photoacoustique d'analyser efficacement les mécanismes photosynthétiques. Le développement d'une méthodologie permettant la mesure simultanée des activités des photosystèmes I et II se révèle particulièrement prometteuse à cet égard.

REMERCIEMENTS

Lorsque vient le temps de résumer trois ans d'efforts, de doutes, de joies, petites ou grandes, je ne peux que constater qu'heureusement, il y avait un grand nombre de personnes pour m'appuyer; c'est pourquoi je veux leur consacrer quelques lignes, ce qui, j'en suis bien conscient, est bien peu...

Dans un premier temps, mes remerciements bien sentis sont dirigés vers mon directeur de thèse, le Dr Roger M. Leblanc. Son ardeur au travail et la grande confiance qu'il m'a manifestée tout au long de mes études graduées n'ont pu que me stimuler à me dépasser...

Je dois certes une fière chandelle (et aussi un ou deux pots... de jus d'orange) à mes ami(e)s et collègues de l'équipe de photoacoustique. Donc un grand et profond merci à Denis Charlebois et Konka Veeranjanyulu pour toutes les (longues) discussions nous obligeant à aller au fond du (des) problème(s), pour leur grande patience et leur amitié qui m'honore. J'ai également eu la chance de travailler avec le Dr Shmuel Malkin, dont le contact, tant personnel que professionnel, m'a été des plus stimulants et bénéfiques. A Lucie, Leila, Maryse, Raymond et Fouad, qui m'ont accompagné à un moment ou un autre de ces années: merci bien sincère. Je me dois de remercier aussi Alain Tessier et André Paquette pour leur aide inestimable lorsque des pépins techniques sont survenus.

Je remercie aussi le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec, l'Université du Québec à Trois-Rivières (Intervention spéciale) et les syndicats des professeurs et des chargés de cours de l'U.Q.T.R. pour m'avoir octroyé pendant ces années des bourses d'étude qui m'ont permis de me concentrer sur mes fonctions d'étudiant.

Finalement, tout ceci n'aurait pas été possible sans le constant support et la grande compréhension de Marie-Hélène; gros bisous également à Emilie, qui a souvent vu partir son papa pour «travailler fort». Je leur dédie spécialement ce travail. Beaucoup de remerciements sont aussi dus à nos deux familles pour leur présence à nos côtés.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES	xii
LISTE DES FIGURES	xv
LISTE DES TABLEAUX	xxiv
1. INTRODUCTION	1
1.1 <u>Les effets de la lumière sur les végétaux</u>	2
1.2 <u>La photosynthèse</u>	9
1.2.1 <u>Le chloroplaste</u>	9
1.2.2 <u>La phase physico-chimique</u>	12
1.2.3 <u>La phase biochimique</u>	22
1.2.4 <u>Les états de transition (état 1 - état 2)</u>	29
1.3 <u>La photoinhibition</u>	32
1.3.1 <u>Définitions et généralités</u>	32
1.3.2 <u>Mécanismes de la photoinhibition</u>	34
1.3.3 <u>Photoinhibition et autres stress environnementaux</u>	39
1.3.3.1 <u>Et basses températures ($T < 10^{\circ}\text{C}$)</u>	39

1.3.3.2 <u>Et hautes températures ($T > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)</u>	41
1.3.3.3 <u>Et déficit hydrique</u>	42
1.3.3.4 <u>Et herbicides</u>	43
1.3.4 <u>Modes de protection</u>	44
1.3.5 <u>Recouvrement</u>	49
1.4 <u>Les objectifs de ce projet de recherche</u>	51
 2. LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE	 55
2.1 <u>Historique</u>	55
2.2 <u>Théorie de l'effet photoacoustique dans les solides</u>	56
2.3 <u>Applications dans l'étude de la photosynthèse</u>	62
2.3.1 <u>Aspect spectroscopique</u>	62
2.3.2 <u>Aspect physiologique</u>	64
2.3.3 <u>Détermination expérimentale de A_{O_2} et EEP</u>	74
 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 81
3.1 <u>Produits utilisés</u>	81
3.2 <u>Le spectromètre photoacoustique</u>	81
3.2.1 <u>Description de l'appareil</u>	82
3.2.2 <u>Mesures photoacoustiques</u>	87

3.3 <u>Le spectrofluorimètre</u>	88
3.3.1 <u>Description de l'appareil</u>	88
3.3.2 <u>Mesures de fluorescence</u>	89
3.4 <u>Le matériel végétal</u>	90
3.4.1 <u>L'érable à sucre</u>	90
3.4.2 <u>Le bleuetier</u>	91
3.4.3 <u>Les autres plantes</u>	92
3.5 <u>L'infiltration d'eau</u>	92
3.6 <u>Le traitement photoinhibiteur</u>	93
3.7 <u>L'analyse pigmentaire</u>	94
 4. LE SIGNAL PHOTOACOUSTIQUE DANS LES FEUILLES	97
4.1 <u>Le signal photoacoustique d'oxygène</u>	98
4.2 <u>L'infiltration d'eau et le signal photoacoustique</u>	111
4.2.1 <u>Les mesures d'emmagasinement d'énergie photosynthétique</u>	112
4.2.2 <u>Les cinétiques thermiques et d'EEP</u>	118
4.2.3 <u>Les propriétés optiques d'une feuille infiltrée</u>	127
 5. MESURE DE L'ACTIVITÉ DES PHOTOSYSTÈMES I ET II	133
5.1 <u>La mesure de $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$</u>	133
5.2 <u>Activité des PS I et PS II lors des transitions d'état</u>	138

5.3 <u>Variation spectrale de EEP_{T_2}, $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$</u>	147
6. EFFETS DE LA PHOTOINHIBITION	158
6.1 <u>Sur l'activité des photosystèmes I et II</u>	158
6.2 <u>Sur les plantes d'ombre et de soleil</u>	173
7. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	179
8. BIBLIOGRAPHIE	184

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

a_s : Coefficient de diffusion thermique (m^{-1})

A_{O_2} : Signal d'oxygène en spectroscopie photoacoustique

A_{PT} : Signal photothermique en spectroscopie photoacoustique

A_0 : Accepteur primaire d'électrons du PS I

A_1 : Accepteur secondaire d'électrons du PS I

ATP: Adénosine triphosphate

ATPase: ATP synthétase

C_i : Concentration (M)

C_s : Chaleur spécifique ($J\ kg^{-1}\ K^{-1}$)

CCL: Complexe pigments-protéines collecteur de lumière

CCL I: CCL du PS I

CCL II: CCL du PS II

CDO: Complexe de dégagement d'oxygène du PS II

cyt: cytochrome (dans le cas du cyt b_{559} , cyt b_6-f)

DCMU: Dichlorophényl diméthyl urée

EEP: Emmagasinage d'énergie photosynthétique

$EEP_{PS\ I}$: Emmagasinage d'énergie du PS I (mesuré à 650 nm)

$EEP_{PS\ I-cy}$: Emmagasinage d'énergie du PS I lié au transport cyclique des électrons
(mesuré à 710 nm)

$EEP_{PS\ I-II}$: Emmagasinage d'énergie du PS I lié au transport linéaire des électrons en provenance du PS II (mesuré à 710 nm)

$EEP_{PS\ II}$: Emmagasinage d'énergie du PS II

EEP_T : Emmagasinage d'énergie photosynthétique total des deux photosystèmes

FC_0 : Sous-unité intramembranaire de l'ATPase (facteur de couplage 0)

FC_1 : Sous-unité extramembranaire de l'ATPase (facteur de couplage 1)

Fd: Ferredoxine

k: Conductivité thermique ($J\ s^{-1}\ m^{-1}\ K^{-1}$)

NADP(H): Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

PA: Photoacoustique

PC: Plastocyanine

Phéo: Phéophytine

P_i : Phosphate inorganique (PO_4^{-3})

PQ: Plastoquinone

PQH_2 : Plastoquinol (suite à la réduction de PQ)

PS I: Photosystème I

PS II: Photosystème II

P680: Centre réactionnel du PS II

P700 (*): Centre réactionnel du PS I (oxydé)

$p(O_2)$: Pression partielle d' O_2

Q_A : Quinone, accepteur primaire du PS II

Q_B : Quinone, accepteur secondaire du PS II

Q_m : Signal photoacoustique en présence du faisceau modulé

Q_{ms} : Signal photoacoustique en présence des faisceaux modulé et saturant blanc

Q_{mrl} : Signal photoacoustique en présence des faisceaux modulé et saturant rouge lointain
($\lambda > 715$ nm)

Rfd: Indice de vitalité (fluorescence)

Rubisco: Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase oxygénase

SOD: Superoxyde dismutase

t: Temps (s)

T: Température (K)

x: position (m)

X: Accepteur d'électrons du PS I

Z: Tyrosine, donneur d'électrons du PS II

α : Diffusivité thermique ($m^2 s^{-1}$)

β : Coefficient d'absorption optique (m^{-1})

ϵ : Absorptivité molaire ($M^{-1} m^{-1}$)

μ_B : Longueur d'absorption optique (m)

μ_s : Longueur de diffusion thermique (m)

ρ : Masse volumique ($kg m^{-3}$)

ω : Fréquence angulaire de modulation ($rad s^{-1}$)

LISTE DES FIGURES

- 1: Le chloroplaste. La section de gauche est une photographie obtenue par microscopie électronique d'un chloroplaste d'épinard . La section de droite est une représentation schématique. 10
- 2: Composition de la membrane thylacoïdienne. (D'après Staehelin et Arntzen, 1983). . . 13
- 3: Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du PS II. CCL: Complexes collecteurs de lumière, M: Assemblage des atomes de manganèse et d'oxygène, CP: Complexe pigments-protéine, PCA: Complexe pigments-protéine accessoire de l'antenne éloignée, PE: Protéines extrinsèques du CDO, PEA: Protéine extrinsèque accessoire, PEQ: Protéine d'écran de la quinone, PIA: Protéine intrinsèque accessoire, Tyr_z: Tyrosine. (D'après Hansson et Wydrzynski, 1990). 17
- 4: Le cycle de Calvin-Benson. P: Phosphate, 3-PGA: 3-Pglycérate, GA 3-P: Glycéraldéhyde 3-P, DHAP:DihydroxyacétoneP, Fru 1,6-diP: Fructose 1,6-diP, Glu 6-P: Glucose 6-P, Ery-4-P: Erythrose 4-P, Xyl 5-P: Xylulose 5-P, Sed 1,7-diP: Sédoheptulose 1,7-diP, Rib 5-P: Ribose 5-P, Rub 1,5-diP: Ribulose 1,5-diP. 24
- 5: Mécanismes de la réduction d'une enzyme-cible catalysée par le système chloroplastique de la thioredoxine. A- Mécanisme direct, B- Mécanisme indirect (D'après Scheibe, 1990). 27
- 6: Mécanisme moléculaire régissant les états de transition. Le NaF peut être utilisé afin d'inhiber l'activité de la kinase, ce qui empêche la transition de l'état 2 vers l'état 1.31

- 7: A- Effet de la photoinhibition sur l'activité de transport d'électrons et la présence de protéines marquées de la membrane thylacoïdienne. (D'après Ohad *et al.*, 1985). B- Représentation schématique du centre réactionnel du PS II et du transport d'électrons. (D'après Kyle, 1987; note: cette représentation n'est plus valable, le centre réactionnel étant composé des protéines D1-D2 (voir figure 3)). 37
- 8: Le cycle de vie de la protéine Q_B 50
- 9: La génération du signal PA dans les solides. S_0 : État fondamental des électrons de la molécule, S_1 : état excité singulet 1, S_2 : état excité singulet 2, T_1 : état excité triplet 1, μ_g longueur de diffusion thermique du gaz de couplage 61
- 10: A- Modes de désexcitation de la chlorophylle a *in vivo*. B- Représentation schématique des mesures photoacoustiques de l'activité photosynthétique d'une feuille. 65
- 11: Le signal PA dans les feuilles, aspect scalaire. A-Le signal PA à basse fréquence de modulation. B-le signal PA à haute fréquence de modulation. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction du faisceau modulé, respectivement. Les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction du faisceau saturant blanc, respectivement. 75
- 12: Aspect vectoriel du signal PA dans les feuilles. A et B-Signal PA brut en phase et en quadrature d'une feuille. C à E: Représentation vectorielle du signal PA dans le temps pendant les ajustements de phase, selon la méthodologie de Poulet *et al.*,

1983. F et G- Signal PA ajusté. Les symboles sont similaires à ceux de la figure 11. 78
- 13: A-Les composantes du spectromètre photoacoustique. B-Modifications apportées lors des mesures simultanées de fluorescence et de photoacoustique. 83
- 14: Spectres de transmittance des filtres utilisés lors des mesures PA. 86
- 15: Variation du signal PA d'une feuille d'érable à sucre dans le temps. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (470 nm, 7 W m⁻², 25 Hz); les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc (150 W m⁻²). 99
- 16: Variation du signal PA en phase (représentant la composante en phase dans le temps de la contribution d'O₂ seulement) de trois échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. Le faisceau saturant est appliqué A-à intervalles réguliers, B- pendant la chute du signal PA et C-à la fin de la chute du signal PA. Conditions similaires à celles de la figure 15, sauf λ : 640 nm. Symboles similaires à ceux de la figure 15. 100
- 17: Variation des signaux de fluorescence modulée (—) et de photoacoustique (- -) d'une feuille d'érable à sucre dans le temps. Conditions similaires à celles de la figure 16 sauf f_{mod} : 110 Hz; symboles similaires à ceux de la figure 15. 102
- 18: Représentation vectorielle des contributions du signal PA dans le temps.

- (—) Contribution photothermique maximale ($T^* = T + EEP$); (- -) Contribution d' O_2 maximale (O_m); (....) Extrémité du vecteur de la contribution d' O_2 dans le temps jusqu'à la valeur finale (O_f), l'intervalle entre chaque point est d'une min. Conditions similaires à celles de la figure 16. 103
- 19: Effet de l'illumination d'un faisceau saturant rouge lointain sur la variation du signal PA en quadrature dans le temps d'une feuille d'érable à sucre. Conditions similaires à celle de la figure 15, sauf λ : 650 nm. Les flèches fines pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction respectivement, du faisceau saturant rouge lointain ($\lambda > 715$ nm, 150 W m^{-2}). Les autres symboles sont similaires à ceux de la figure 15. 104
- 20: Effet de l'intensité du faisceau modulé sur la variation du signal PA en phase dans le temps de trois différents échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. Faisceau modulé: 640 nm, 15 Hz, (—) 1 W m^{-2} , (- -) 7 W m^{-2} , (....) 16 W m^{-2} ; faisceau saturant blanc: 350 W m^{-2} . Symboles similaires à ceux de la figure 15. . 105
- 21: Effet de la fréquence de modulation sur la variation du signal PA en phase dans le temps de quatre échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. (—) 15 Hz, (- -) 25 Hz, (---) 50 Hz, (....) 80 Hz. Autres conditions similaires à celles de la figure 16. Symboles similaires à ceux de la figure 15. 107
- 22: Effet de l'infiltration d'eau sur le signal PA de feuilles de pois. Signal PA sans ajustement de phase avant (A) et après (B) l'infiltration. Signal PA avec ajustement de phase avant (C) et après (D) l'infiltration. p représente la composante en phase

- alors que q représente la composante en quadrature du signal PA. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (680 nm, 12,7 W m⁻², 25 Hz). Les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc (450 W m⁻²). 113
- 23: Effet de la fréquence de modulation sur la mesure de l'EEP de feuilles de pois (▲) et d'érable à sucre (●) infiltrées. Faisceau modulé: 650 nm, 7 W m⁻². Autres conditions similaires à celles de la figure 22. 117
- 24: Effet du temps d'adaptation à l'obscurité sur les cinétiques thermiques (et leur inverse, d'EEP) de feuilles de pois. A- 1 h, B- 0,5 h, C- 1 h, D- 2 h. Sur ces tracés, la ligne de base est placée en-deça du zéro habituel suite à la suppression de ce dernier sur l'amplificateur, et la sensibilité est étendue (note: elle n'est pas la même pour tous les tracés). Les barres horizontales montrent le niveau du signal PA en présence du faisceau saturant blanc, une référence pour déterminer l'EEP. Conditions et symboles similaires à ceux de la figure 22. Note: L'échelle de temps n'est pas la même pour toutes les courbes. 119
- 25: Comparaison entre les cinétiques thermique (tracé du haut) et d'oxygène (tracé du bas) de la même feuille de pois lors d'une transition obscurité-éclairage (préadaptée pendant 30 min à l'obscurité). La cinétique d'O₂ (composante en phase du signal PA) a été enregistrée avant l'infiltration. Conditions et symboles similaires à ceux de la figure 22. 121

- 26: Insert: Schéma d'une cinétique thermique, suite à la transition obscurité-illumination, présentant les paramètres utilisés dans la figure principale. Symboles similaires à ceux de la figure 22.
- A- Effet du temps de préadaptation à l'obscurité sur le rapport EEP/EEP_{es} . Faisceau modulé: 650 nm, 25 Hz, 7 W m⁻². Autres conditions similaires à celles de la figure 22.
- B- Effet de l'intensité du faisceau modulé sur le rapport EEP/EEP_{es} . Faisceau modulé: 650 nm, 25 Hz. Autres conditions similaires à celles de la figure 22. 122
- 27: Cinétiques thermiques (tracé du haut) et d'oxygène (tracé du bas) de la même feuille de pois lors de l'extinction du faisceau saturant blanc. La cinétique d'O₂ a été enregistrée avant l'infiltration. Conditions similaires à celles de la figure 25, symboles similaires à ceux de la figure 22. 125
- 28: Spectres photoacoustiques de feuilles matures de pois.
- A- Spectres PA de feuilles dans l'air avec (-.-) et sans (...) le faisceau saturant blanc.
- B- Spectres PA de feuilles infiltrées avec (—) et sans (---) le faisceau saturant blanc. Faisceau modulé: 20 Hz; Faisceau saturant blanc: 300 W m⁻². Les spectres sont une moyenne de 6 échantillons différents. Les mêmes feuilles ont été utilisées pour les quatre spectres. 128
- 29: Spectres photoacoustiques de feuilles matures de fraisier.
- A- Spectres PA de feuilles dans l'air avec (-.-) et sans (...) le faisceau saturant blanc.

- B- Spectres PA de feuilles infiltrées avec (—) et sans (---) le faisceau saturant blanc. Conditions similaires à celles de la figure 28. Les spectres sont une moyenne de 5 échantillons différents. Les mêmes feuilles ont été utilisées pour les quatre spectres. 129
- 30: Représentation schématique du signal PA d'une feuille, qui permet la mesure de EEP_T , $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$. Les flèches ondulées pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé. Les flèches épaisses pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc. Les flèches fines pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant rouge lointain. 134
- 31: Effet de l'intensité du faisceau saturant rouge lointain sur la mesure d' $EEP_{PS\ I}$ de feuilles d'érable à sucre. Faisceau modulé: 650 nm, 7 W m⁻², 80 Hz; Faisceau saturant blanc: 300 W m⁻²; Faisceau saturant rouge lointain: $\lambda > 715$ nm. 136
- 32: Signal PA typique d'une feuille d'érable à sucre dans l'état 1 (A) et dans l'état 2 (B). Les conditions sont similaires à celles de la figure 31. Les symboles sont similaires à ceux de la figure 30. 140
- 33: Variation du rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ dans le temps lors des transitions d'état de feuilles d'érable à sucre. Les disques de feuille ont été amenés à un état stationnaire (1 ou 2, selon le cas) pendant 30 min, avant la variation d'état (vers l'état 2 ou 1, selon le cas). Les conditions sont similaires à celles de la figure 31. 143

- 34: Variation du rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ dans le temps lors des transitions vers l'état 1 (o) ou 2 (●) de feuilles d'érable à sucre préilluminés 10 min avec le faisceau saturant blanc ($160\ W\ m^{-2}$). Les autres conditions sont similaires à celles de la figure 31. 144
- 35: Effet de l'intensité du faisceau saturant rouge lointain sur la mesure d' $EEP_{PS\ I}$ de feuilles d'érable à sucre à 470 nm (●), 560 nm (o), 640 nm (■) et 680 nm (□). Faisceau modulé: 80 Hz; Faisceau saturant blanc: $300\ W\ m^{-2}$; Faisceau saturant rouge lointain: $\lambda > 715\ nm$ 148
- 36: Effet de l'intensité du faisceau modulé (exprimée par le signal PA en présence du faisceau saturant blanc (Q_{ms})) sur la mesure de l' EEP_T de feuilles d'érable à sucre à 470 nm (A), 560 nm (B), 640 nm (C) et 680 nm (D). Les différents symboles représentent différents échantillons.
- Inserts: Inverse de l' EEP_T en fonction de l'intensité lumineuse. Conditions similaires à celles de la figure 35. 150
- 37: Rendement quantiques d' EEP_T (o), d' $EEP_{PS\ I}$ (x) et d' $EEP_{PS\ II}$ (●) de feuilles d'érable à sucre. Conditions similaires à celles de la figure 35. 153
- 38: Signal PA d'une feuille d'érable à sucre enregistré à 705 nm. Les flèches ondulées pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (705 nm, $2,4\ W\ m^{-2}$; 100 Hz). Les flèches épaisses pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc ($330\ W\ m^{-2}$). Les flèches brisées pointant vers le

haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant bleu-vert (25 W m^{-2}).	160
39: Variation de EEP_T , $EEP_{PS I}$ et $EEP_{PS II}$ dans le temps pendant le traitement photoinhibiteur ($1\ 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de feuilles d'érable à sucre. λ : 650 nm , 2 W m^{-2} ; faisceau saturant rouge lointain: 150 W m^{-2} . Les autres conditions sont similaires à celles de la figure 38.	163
40: Corrélation entre les effets produits par le traitement photoinhibiteur sur le rapport A_{O_2}/A_{PT} et l' $EEP_{PS II}$ de l'érable à sucre. Les conditions sont similaires à celles de la figure 39.	164
41: Effets de différentes intensités lumineuses sur l' EEP_T , l' $EEP_{PS I}$ et l' $EEP_{PS II}$ de feuilles d'érable à sucre. Les conditions sont similaires à celles de la figure 39.	170

LISTE DES TABLEAUX

I. Adaptations aux niveaux structural et fonctionnel des membranes thylacoïdiennes à l'intensité lumineuse	7
II. Effet de l'infiltration d'eau sur l'activité photosynthétique (EEP)* de feuilles d'érable à sucre	115
III. Effet de l'infiltration d'une solution de DCMU* sur l'EEP** de feuilles de pois	115
IV. Rapports de l'EEP initial/EEP état stationnaire* mesurés à différentes fréquences de modulation	123
V. EEP_T , $EEP_{PS\ I}$, $EEP_{PS\ II}$, $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ et distribution de la lumière entre le PS I (α) et le PS II (β) pendant les transitions d'état chez des feuilles d'érable	141
VI. Effet de l'infiltration de NaF^* ou de $NaCl$ sur les transitions d'état de semis d'érable à sucre	146
VII. Effet de la longueur d'onde sur l'efficacité photochimique maximale* et le taux de saturation de la photosynthèse** de feuilles d'érable à sucre	152
VIII. Effet d'un traitement photoinhibiteur* sur l'activité photosynthétique des PS I et PS II de feuilles d'érables à sucre	162
IX. Effets d'un traitement photoinhibiteur* sur l'activité photosynthétique de feuilles de semis d'érable à sucre et de bleuetiers	165
X. Effet d'un traitement photoinhibiteur* sur l'activité photosynthétique de feuilles d'érable à sucre pré-adaptées à des conditions d'état 1.	171

- XI. Variation de $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ de feuilles de bleuetiers lors des transitions d'état suite à un traitement photoinhibiteur* 172
- XII. Effet d'un traitement photoinhibiteur sur des plants d'ombre et de soleil de bleuetier. 175

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

La photosynthèse, un des processus les plus importants de l'histoire de la vie sur la Terre s'est produit pour la première fois il y a environ 3,2 millions d'années. Jusqu'à ce moment, des bactéries anaérobies, les seuls organismes autotrophes, puisaient leur énergie de la transformation de composés sulfurés (H_2S ou soufre), réaction catalysée par la lumière (Olson et Pierson, 1986). L'apparition de cyanobactéries capables de dégager de l'oxygène à partir d'eau a permis de transformer l'atmosphère réductrice en atmosphère oxydante; ce qui a amené une modification importante de l'environnement (Rawn, 1989) et, ultimement, l'apparition des organismes hétérotrophes terrestres.

Outre la photosynthèse, la lumière régit plusieurs processus chez les plantes. Les buts de ce premier chapitre sont les suivants: (i) décrire certains mécanismes végétaux photosensibles; (ii) définir les effets et le mécanisme d'action de la photoinhibition, stress se produisant lorsqu'un surplus de lumière est absorbé par un organisme photosynthétique; (iii) présenter les objectifs sous-tendant ce projet de recherche.

1.1 Les effets de la lumière sur les végétaux

Du taux de germination des graines jusqu'à la sénescence des plantes matures, la lumière active de nombreux processus végétaux. Dans un premier temps, analysons la contribution de la lumière à ces divers mécanismes.

Dans la nature, les graines de plusieurs espèces de plantes requièrent la présence de lumière lors de la germination (orme, laitue); dans certains cas, la lumière augmente le taux de germination (sapin Douglas) alors que la germination des graines de certaines plantes (érable, eucalyptus) se révèle inhibée par la lumière (Krugman *et al.*, 1974; Heller, 1978). Dans tous les cas de stimulation positive cependant, les intensités lumineuses mises en jeu sont relativement faibles; quelques W m^{-2} suffisent à enclencher la levée de la dormance. La lumière rouge possède l'effet le plus significatif sur la semence, la lumière bleue nécessitant des intensités de 30 à 100 fois supérieures pour générer le même effet (Heller, 1978). On croit donc que le phytochrome est responsable de ce phénomène (Krugman *et al.*, 1974). Il absorbe l'énergie lumineuse afin de la convertir en énergie chimique qui sera responsable de l'activation (ou de l'inhibition) de certains enzymes ou de gènes, afin de lever l'état de dormance. Cette implication du phytochrome dans un processus végétal n'est pas unique comme nous le verrons plus loin.

Suite à la germination, lorsque le coléoptile commence à s'élever au-dessus de la terre, l'orientation de sa croissance est régie par la lumière via le processus de phototropisme. La grande majorité des plantes à port dressé montre un phototropisme positif à l'exposition lumineuse (Heller, 1978). L'inégale distribution de part et d'autre des surfaces de la tige de l'auxine, une hormone responsable de l'élongation cellulaire, expliquait ce phénomène (Went, 1928) jusqu'à tout récemment. Des expériences récentes ont démontré que c'est plutôt un gradient latéral de concentration d'inhibiteurs de croissance qui serait responsable du phototropisme (Hasegawa *et al.*, 1989). Le mécanisme exact d'activation du phototropisme demeure un sujet brûlant d'actualité en physiologie végétale (Trewavas, 1992).

En plus du phototropisme qui affecte la tige, deux types de mouvements des feuilles en réponse à la lumière sont reconnus: nyctinastiques et héliotropiques (Satter, 1979). Les mouvements nyctinastiques se produisent à la nuit lorsque les feuilles passent d'une position horizontale à une verticale et *vice-versa* au matin. Ce phénomène est bien connu dans le cas des feuilles de haricot et d'autres espèces de légumineuses (Satter, 1979). Quant aux mouvements héliotropiques, ils sont de deux ordres, à savoir, diahéliotropique et parahéliotropique. Le mouvement des feuilles chez les plantes diahéliotropiques (ce qui est courant chez les plantes désertiques) vise à les conserver perpendiculaires à la radiation incidente, ce qui maximise leur efficacité photosynthétique tout au long de la journée. Quand aux plantes parahéliotropiques, elles meuvent

leurs feuilles afin de les conserver parallèles à la radiation incidente, ce qui diminue l'absorption lumineuse (Ehleringer et Forseth, 1980).

La photopériodicité quotidienne (alternance des jours et des nuits), avec ses variations annuelles, provoque sur les organismes des réactions dont l'ensemble constitue le photopériodisme. Le photopériodisme affecte surtout la floraison mais aussi, quoique de façon beaucoup plus discrète, la croissance végétative (Heller, 1978). Certaines plantes (comme par exemple la variété de tabac Maryland Mammoth, un classique du genre) nécessitent des périodes de luminosité inférieures à 13 ou 14 heures pour fleurir, elles sont dites de jours courts. A l'opposé, les plantes de jours longs, tel l'épinard, requièrent plus de 14 ou 15 heures afin d'assurer leur floraison (Devlin, 1975). Il existe néanmoins des espèces indifférentes (pois, tomate), qui n'exigent qu'un apport lumineux minimal afin d'assurer une quantité d'assimilats photosynthétiques suffisante pour terminer leur cycle floral (Heller, 1978).

Outre la germination des graines et le photopériodisme floral, le phytochrome contrôle un grand nombre de processus végétaux. De nombreux processus de croissance sensibles, sont affectés positivement (cotylédons et jeunes feuilles de Dicotylédones) ou négativement (entrenoeuds de jeunes plantules), par le phytochrome. De plus, ce pigment est aussi impliqué dans plusieurs mouvements d'organites (chloroplastes entre

autres) et dans la synthèse de certains enzymes et pigments, y compris dans la première étape menant à la protochlorophylle, un précurseur de la chlorophylle (Heller, 1978).

Le phytochrome constitue un complexe pigment-protéine sensible à la lumière. La lumière rouge (maximum à 660 nm) peut induire un effet, alors qu'une exposition à la lumière rouge lointain (maximum à 733 nm) peut annuler, voire renverser l'effet de la lumière rouge (Jabben et Holmes, 1983). Deux formes du phytochrome sont observées dans la nature. Dans son état stable et suite à la synthèse protéique, la forme P_r domine. L'exposition à la lumière rouge induit la forme P_{fr} , qui est celle qui contrôle plusieurs processus végétaux, comme je l'ai déjà écrit. La forme P_{fr} peut être retransformée en P_r via une exposition à la lumière rouge lointain ou, chez certaines espèces, par une conversion métabolique à l'obscurité (ce qui prend environ une heure). Chez d'autres espèces végétales, la forme P_{fr} est purement et simplement dégradée, et la forme P_r doit être synthétisée *de novo* (Jensen et Salisbury, 1984). Le phytochrome, grâce à son dimorphisme, peut donc être qualifié à la fois de senseur végétal de la qualité de l'environnement lumineux et d'acteur dans la réponse morphogénétique qui s'ensuit.

L'intensité et la qualité de la lumière que reçoit la plante lors de sa croissance déterminent aussi nombre de paramètres anatomiques.

Les travaux menés par Hanson (1917) montrent le net effet de l'intensité lumineuse sur la morphologie foliaire. Les feuilles sises à la périphérie de la couronne sont plus épaisses et présentent deux ou trois assises de cellules mésophylliennes longues et serrées. Quant aux feuilles sises à l'intérieur de la couronne ou à la base, leur seule assise de cellules mésophylliennes s'avère relâchée et plusieurs espaces aérifères y sont retrouvés.

A un autre niveau d'organisation, l'intensité lumineuse lors de la croissance induit plusieurs changements dans le chloroplaste (voir Tableau I). Les plus importants concernent l'augmentation du volume chloroplastique et l'agrandissement des grana (empilement de plus de saccules de plus grandes dimensions) dans les feuilles d'ombre (Anderson *et al.*, 1988). Ceci altère donc la quantité des différents complexes protéiques (photosystèmes, cytochromes, ATP synthétase, ...) présents dans la membrane thylacoïdienne.

Les travaux de Lee et Whitmarsh (1989) démontrent qu'une augmentation de l'intensité lumineuse lors de la croissance du pois induit une augmentation de la quantité (par unité de chlorophylle) de PS II, des cytochromes b_{559} et f, et, dans une moindre mesure, de PS I. L'intensité lumineuse régit aussi l'accumulation des divers complexes pigments-protéines lors du verdissement (Mathis et Burkey, 1989). Ces variations dans la composition de l'appareil photosynthétique induisent forcément une variation de son

Tableau I
Adaptations aux niveaux structural et fonctionnel
des membranes thylacoïdiennes à l'intensité lumineuse

Paramètres	Feuilles Ensoleillées	Feuilles Ombragées
Grandeur du chloroplaste	Normale	Large
Volume stromatique/thylacoïde	Élevé	Bas
Membranes thylacoïdiennes par chloroplaste	Quelques	Nombreuses
Membrane granaire/stromatique	Bas	Élevé
Chlorophylle / chloroplaste	Bas	Élevé
Chlorophylle <u>a</u> /chlorophylle <u>b</u>	Élevé	Bas
Xanthophylles / β -carotène	Bas	Élevé
P680 / chlorophylle	Élevé	Bas
Cytochrome f / chlorophylle	Élevé	Bas
P700 / chlorophylle	Peu de variation	
FC ₁ de l'ATPase / chlorophylle	Élevé	Bas
Photosystème II/Photosystème I	Élevé	Bas
Activité des PS I et PS II	Élevée	Basse
Intensité lumineuse saturante	Élevée	Basse
Rendement quantique du transport d'élec- trons	Pas de variation	

D'après Anderson *et al.*, 1988

activité, tel que démontré par von Caemmerer et Farquhar (1984), Lee et Whitmarsh (1989), De la Torre et Burkey (1990) pour ne citer que quelques travaux. Dans ces trois études, les plantes de soleil possèdent une activité photosynthétique, telle qu'exprimée par les échanges de CO_2 ou d' O_2 et le transport d'électrons, supérieure à celle observée chez les plantes d'ombre. De plus, Chow et Anderson (1987 a et b), ont montré que lors de l'acclimatation au soleil de plantes adaptées initialement à l'ombre, une variation des composantes de l'appareil photosynthétique est observée, ce qui amène une augmentation de l'activité photosynthétique.

Avant de poursuivre mon propos, je me permets une petite parenthèse. Lorsque l'on parle d'adaptation au soleil ou à l'ombre, on pense immédiatement à des plantes différentes placées sous différentes intensités lumineuses, ou aux feuilles des arbres qui forment la voûte d'une forêt par rapport à celles poussant dans la couronne de l'arbre, voire celles croissant dans leur ombrage. Il ne faut surtout pas perdre de vue qu'à l'intérieur même de la feuille, il existe un gradient lumineux.

Les travaux de Terashima et Saeki (1983) sur la transmission lumineuse au travers d'une feuille de camélia montrent un spectre de transmission très près de celui observé au travers du feuillage d'une forêt tropicale (Yoda, 1974). C'est pourquoi, les chloroplastes des cellules spongieuses (situées dans la partie inférieure d'une feuille) présentent une structure chloroplastique similaire à celle des feuilles d'ombre (gros grana, rapport

chl a/chl b faible) (Terashima *et al.*, 1986, Terashima et Inoue, 1985, Aro *et al.*, 1986). Ce genre d'observations doit nous rendre critique quant à l'utilisation de chloroplastes provenant de feuilles différentes (particulièrement celles de strates différentes d'une plante) -voire d'une même feuille- dans des études mécanistiques faisant intervenir la lumière, puisqu'une diversité certaine existe entre ceux-ci.

1.2 La photosynthèse

1.2.1 Le chloroplaste

Au sein de la cellule végétale, le chloroplaste constitue l'organe responsable de l'activité photosynthétique (figure 1). D'une taille de 1 à 10 μm de diamètre selon l'espèce, on a pu recenser de un, dans une algue comme *Chlorella*, jusqu'à 40 chloroplastes par cellule chez certaines plantes supérieures (Lehninger, 1981).

Le chloroplaste possède une enveloppe composée de deux membranes; une première, la membrane chloroplastique, sépare le cytoplasme cellulaire du stroma, le liquide interne du chloroplaste. Quant à la seconde membrane, interne, elle forme, suite à des repliements sur elle-même, la membrane thylacoïdienne. Cette membrane peut former des amoncellements, appelés grana, qui sont reliés entre eux par les lamelles stromatiques. C'est sur, ou à l'intérieur de, cette membrane bilipidique que nous

retrouvons tous les complexes (pigments)-protéines et les composés chimiques responsables de l'aspect physico-chimique de la photosynthèse.

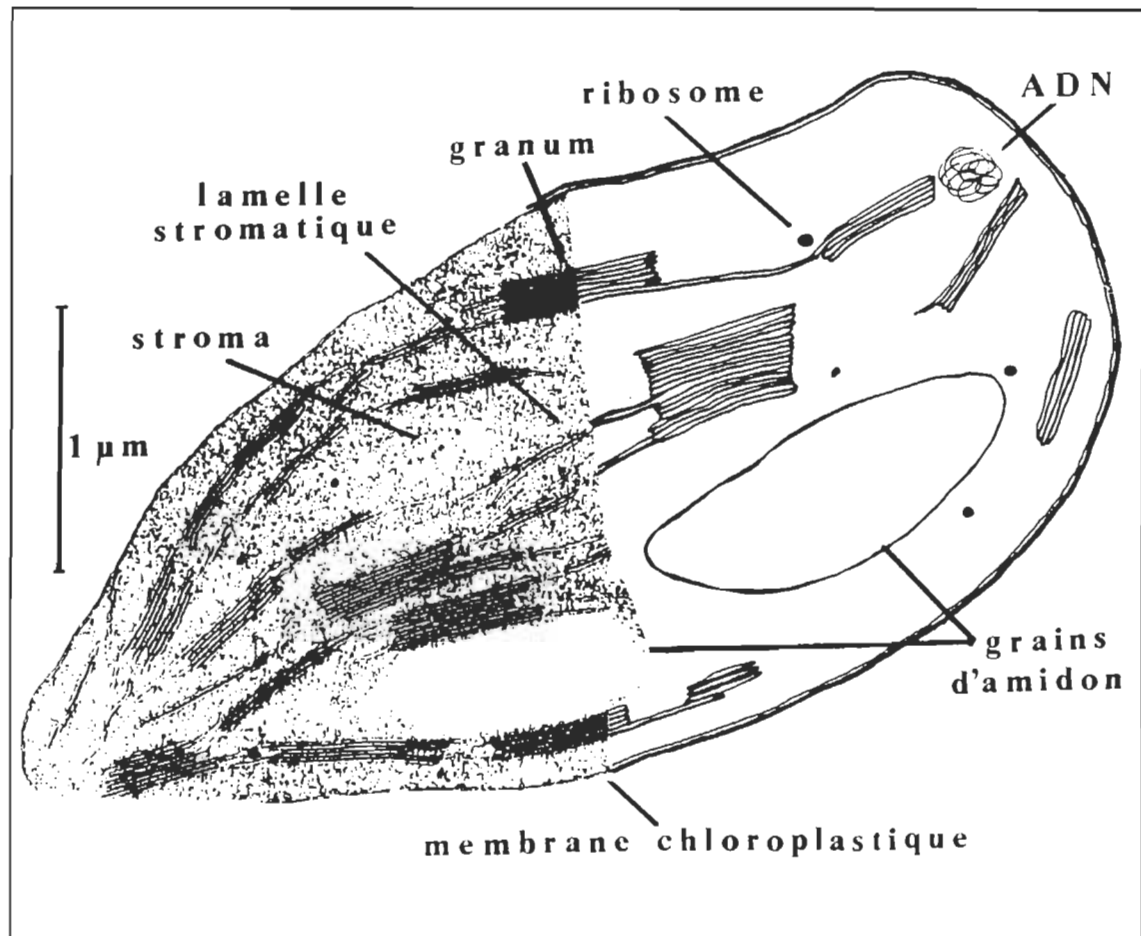


Figure 1: Le chloroplaste. La section de gauche est une photographie obtenue par microscopie électronique d'un chloroplaste d'épinard . La section de droite est une représentation schématique. La photographie est tirée de Kannangara *et al.*, 1977 (la barre d'échelle vaut 1 µm).

Les différents enzymes et composés biochimiques liés à la fixation du CO_2 baignent dans le stroma. On peut aussi y retrouver des granules d'amidon, produit ultime de l'activité photosynthétique, qui constituent les réserves glucidiques de la cellule (Lehninger, 1981).

Le chloroplaste possède le matériel nucléaire et tout l'appareillage enzymatique nécessaire à la synthèse d'une quarantaine de ses protéines constitutives. Par exemple, tous les polypeptides intrinsèques du PS II, du complexe collecteur de lumière du PS II, du cytochrome b_{559} , du centre réactionnel du PS I, les polypeptides formant la grosse sous-unité de la Rubisco originent du génome chloroplastique (Weil, 1987).

De façon globale, la photosynthèse utilise l'énergie produite lors de l'hydrolyse de l'eau, réaction catalysée par la lumière, afin de dégager de l'oxygène et de générer un potentiel chimique et réducteur via certains composés chimiques. Ce potentiel réducteur est par la suite utilisé lors de la fixation du CO_2 atmosphérique. Jusqu'à récemment, nous avions l'habitude de désigner ces deux phases de la photosynthèse comme étant les phases claire et obscure, respectivement, puisque la première nécessitait de la lumière et la seconde était de nature biochimique (sans recours à l'énergie lumineuse). Ces appellations ne sont plus tout-à-fait exactes puisqu'il a été montré que les deux phases requièrent de la lumière lors de leur activation (Buchanan, 1981, Budde et Randall, 1990).

C'est pourquoi, dans les prochaines lignes, j'ai opté pour les dénominations suivantes concernant les deux étapes de la photosynthèse: (i) La phase physico-chimique est reliée aux réactions qui, suite à l'absorption de lumière, mènent au dégagement d' O_2 , à la génération d'un gradient électrochimique de protons, et à la synthèse d'ATP et de NADPH. (ii) La phase biochimique désigne l'ensemble des réactions enzymatiques conduisant à la fixation du CO_2 dans les composés trioses phosphatés et leur transformation en glucides plus complexes.

1.2.2 La phase physico-chimique

La membrane thylacoïdienne est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérés des complexes protéiques et des intermédiaires du transport d'électrons (figure 2). C'est à ce niveau que se produit la phase physico-chimique de la photosynthèse.

Deux grands complexes pigments-protéines, opérant en série, sont responsables de la capture de l'énergie photonique et de sa transformation éventuelle en énergie chimique; ce sont les photosystèmes I et II. Le complexe protéique du cyt b_6-f permet d'accepter les électrons en provenance du PS II et de les transférer vers le PS I. Les plastoquinones et les plastocyanines, des molécules mobiles, assurent la liaison électronique entre le PS II et le cyt b_6-f et entre le cyt b_6-f et le PS I, respectivement. Finalement, l'ATP-synthétase (ATPase) constitue un complexe multi-protéique qui vise à

utiliser l'énergie contenue dans le gradient électrochimique de protons afin de la convertir en énergie chimique lors de la synthèse de l'ATP.

Le photosystème I (PS I) de l'orge possède 11 polypeptides différents, dont 5 sont codés au niveau chloroplastique (Scheller et Moller, 1990). Le centre réactionnel, P700, et les accepteurs A_0 , A_1 et X sont situés dans le complexe pigments-protéine 1 (CP1, Golbeck, 1987). Deux sous-unités (PS I-A et PS I-B), de masse d'environ 82 kDa chacune, forment probablement un dimère dans le CP1. Les complexes Fe-S sont quant

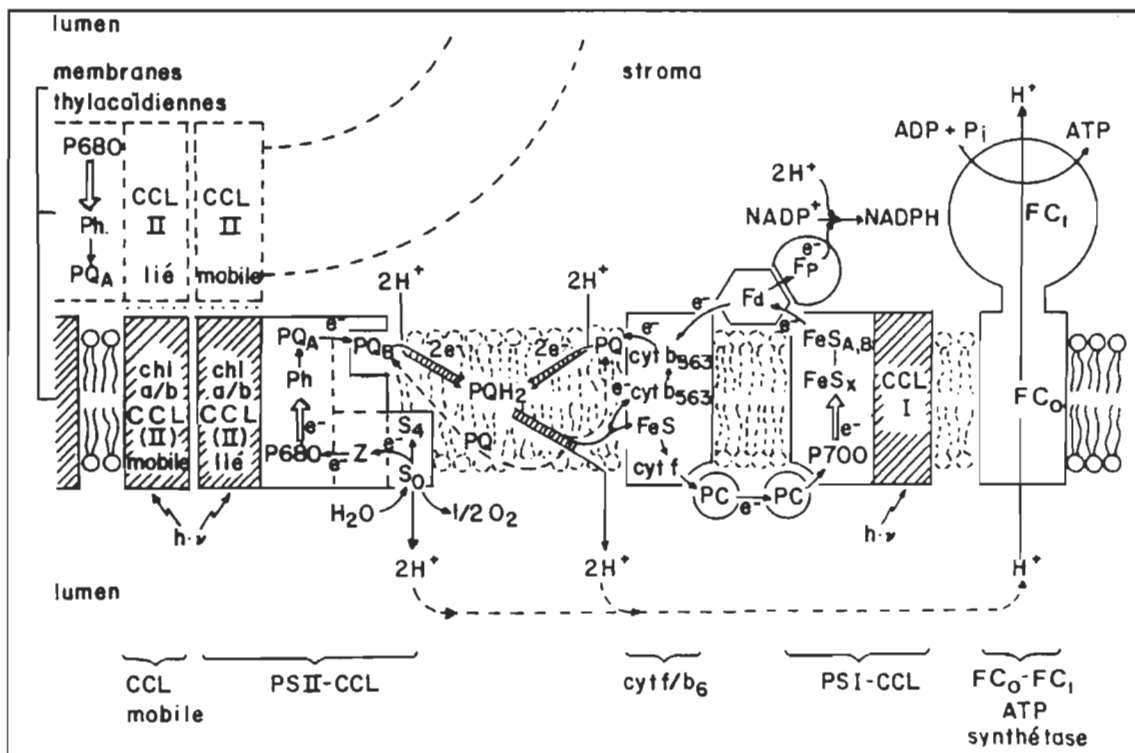


Figure 2: Composition de la membrane thylacoïdienne. (D'après Staehelin et Arntzen, 1983).

à eux intégrés dans un polypeptide de 9 kDa (PS I-C). Quant à la ferredoxine, elle est localisée dans un polypeptide périphérique, du côté stromatique, de 20 kDa (PS I-D). La sous-unité PS I-F (19 kDa) serait responsable de l'interaction entre la plastocyanine et le PS I. Les autres polypeptides, de faible masse moléculaire, serviraient de points d'ancrage aux différents polypeptides du centre réactionnel (Scheller et Moller, 1990).

Deux complexes pigments-protéines servent de complexes collecteurs de lumière (CCL) pour le centre réactionnel du PS I (Bassi et Simpson, 1987). La séquence de transfert d'énergie entre les différentes sous-unités se révèle être : CCLI-680¹, composée de 24 chl a et 8 chl b, suivie de CCLI-730, composée de 66 chl a et 22 chl b vers le CPI qui contient 90 chl a (Bassi et Simpson, 1987). Sous certaines conditions lumineuses environnementales, des polypeptides du complexe collecteur mobile du PS II peuvent venir s'attacher aux CCLI. Nous y reviendrons un peu plus loin.

Suite à l'absorption d'un photon par un des complexes collecteurs de lumière, la migration de l'énergie se fait en direction du centre réactionnel (transfert de type Förster). C'est à cet endroit que se produit l'excitation de la chlorophylle (probablement un dimère) du centre réactionnel et, ultimement, la séparation de charge (Sauer, 1981). Le P700⁺ recueille un électron de la plastocyanine, une protéine cuivrique située du côté luminal de la membrane, afin de retourner à son état fondamental (Mathis et Rutherford,

¹ Les valeurs suivant le nom du complexe pigments-protéines réfèrent à la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence de ces complexes à 77 K.

1987). L'électron libéré par le P700 est par la suite accepté par l'accepteur A_0 , une chl a , puis transféré à l'accepteur A_1 , la vitamine K_1 , ce qui stabilise le transfert électronique (Brettel *et al.*, 1986). Les complexes Fe-S liés à la membrane thylacoïdienne transmettent l'électron jusqu'à la ferredoxine, sise à la surface membranaire. Finalement, l'enzyme ferredoxine:NADP oxydoréductase catalyse la réduction du $NADP^+$. Cette étape constitue la fin du transport dit linéaire des électrons; le NADPH formé sera ultérieurement utilisé lors de la fixation du CO_2 atmosphérique.

Il existe un transport cyclique des électrons autour du PS I. Dans ce type de transport, les électrons originant du PS I sont drainés de la ferredoxine vers le bassin de plastoquinones, via le cytochrome b_{563} (O'Keefe, 1989). Ils sont par la suite réacheminés vers le PS I par les intermédiaires normaux du transport d'électrons. La réduction des molécules de plastoquinone en plastoquinol implique le transport de protons de l'extérieur vers l'intérieur du thylacoïde. Ultimement, le gradient de protons ainsi généré permet la synthèse d'ATP (voir un peu plus loin). La particularité réside en fait que cette phosphorylation d'ADP, dite cyclique, n'est pas corrélée avec la production de NADPH, ce qui, croit-on, permet de conserver des quantités d'ATP suffisantes pour fixer le CO_2 atmosphérique et pour répondre à des besoins énergétiques bien précis (en cas de stress par exemple) (Forti, 1987).

L'efficacité du transport électronique entre le PS I et le NADPH s'avère aussi diminuée par un autre phénomène, expliqué par Mehler en 1951. Lors de la réaction de Mehler, ou transport d'électrons pseudo-cyclique, un électron est arraché à la chaîne de transport d'électrons par de l'oxygène. Le radical superoxyde ainsi formé se révèle très toxique pour les différents composants membranaires (Eltner, 1982). Il est détoxifié via le système superoxyde dismutase (SOD) où il sera successivement transformé en peroxyde, puis en eau. Ainsi, la réaction de Mehler implique la consommation d'oxygène de la part du chloroplaste. Cette notion nous sera utile à l'intérieur de ce travail. D'un point de vue physiologique, on croit que la réaction de Mehler permet de dissiper un éventuel surplus énergétique qui peut se produire lors de stress environnementaux (Wu *et al.*, 1991).

Le photosystème II ((PS II) pour un enzymologiste, eau: plastoquinone oxydoréductase) constitue certes celui des deux photosystèmes qui a été le plus étudié et de ce fait, le mieux connu (Govindjee et Wasielowski, 1989). D'un point de vue fonctionnel, nous pouvons subdiviser le PS II en trois domaines (figure 3): (i) le complexe du noyau composé de six protéines et de cofacteurs (protéines D1, D2, CPa-1 et CPa-2, cyt b_{559} (2 protéines), chlorophylles, quinones, hèmes et fer); (ii) le complexe de dégagement d' O_2 comprenant trois protéines extrinsèques et ses cofacteurs (protéines de 16, 23 et 33 kDa, Mn^{2+} , Ca^{2+} et Cl^-) et, (iii) les complexes pigments-protéines du complexe collecteur de lumière (CP29, CP27 et CP24) (Staehelin et Allen, 1990).

STROMA

LUMEN

MEMBRANE THYLACOIDE

ANTENNE ELOIGNEE
(~200 Chl a+b)

ANTENNE RAPPROCHEE
(40-70 Chl a)

CENTRE REACTIONNEL

COMPLEXE DE DEGAGEMENT O_2

$2H_2O$

$O_2 + 4H^+$

$h\nu$

$2H^+$

Labels in diagram: GCL II, CP47, P680, P680+, P680-, PEA, PO II, PSII, PSI, Pheo, QA, QB, CP43, TyrZ, B1, B2, M, YD, C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18, C-19, C-20, C-21, C-22, C-23, C-24, C-25, C-26, C-27, C-28, C-29, C-30, C-31, C-32, C-33, C-34, C-35, C-36, C-37, C-38, C-39, C-40, C-41, C-42, C-43, C-44, C-45, C-46, C-47, C-48, C-49, C-50, C-51, C-52, C-53, C-54, C-55, C-56, C-57, C-58, C-59, C-60, C-61, C-62, C-63, C-64, C-65, C-66, C-67, C-68, C-69, C-70, C-71, C-72, C-73, C-74, C-75, C-76, C-77, C-78, C-79, C-80, C-81, C-82, C-83, C-84, C-85, C-86, C-87, C-88, C-89, C-90, C-91, C-92, C-93, C-94, C-95, C-96, C-97, C-98, C-99, C-100.

Figure 3: Représentation schématique de l'organisation fonctionnelle du PS II. CCL: Complexes collecteurs de lumière, M: Assemblage des atomes de manganèse et d'oxygène, CP: Complexe pigments-protéine, PCA: Complexe pigments-protéine accessoire de l'antenne éloignée, PE: Protéines extrinsèques du CDO, PEA: Protéine extrinsèque accessoire, PEQ: Protéine d'écran de la quinone, PIA: Protéine intrinsèque accessoire, Tyr_r: Tyrosine. (D'après Hansson et Wydrzynski, 1990).

Les gènes des protéines de l'antenne, du centre réactionnel et de celles contenant le cytochrome b_{559} (cyt b_{559}) se retrouvent au niveau du génome chloroplastique, alors que les protéines dites extrinsèques, responsables du dégagement d' O_2 sont codées dans le noyau (Murata et Miyao, 1989).

Au niveau du noyau du PS II, deux complexes pigments-protéines (de 43 et 47 kDa) sont responsables de l'absorption lumineuse et du transfert énergétique vers le centre réactionnel. La séquence de transfert semble être CPa-2 (43 kDa), vers CPa-1 (47 kDa) vers le centre réactionnel puisque la protéine CPa-2 s'avère plus facilement relarguée lors de traitements. De plus, on croit que la protéine CPa-1 aurait un rôle à jouer au niveau de la stabilisation des protéines du centre réactionnel auxquelles elle est associée (Bricker, 1990, Ghanotakis et Yocum, 1990).

Le centre réactionnel photochimique est inclus dans deux protéines, les protéines D1 (32 kDa, aussi appelée protéine Q_B) et D2 (34 kDa). Ces deux protéines comprennent les donneurs primaires d'électrons, D et la tyrosine (Z); l'accepteur primaire d'électrons, la phéophytine; et les accepteurs secondaires, les quinones Q_A et Q_B (Ghanotakis et Yocum, 1990). Suite à la migration de l'énergie excitonique en provenance des complexes collecteurs de lumière vers le centre réactionnel, une séparation de charges s'opère au niveau du P680 (une paire de chl a) et l'électron est accepté par la phéophytine. La stabilisation de l'état excité s'effectue lorsque l'électron est accepté par la

quinone Q_A . Par la suite, l'électron est transporté au-delà du centre réactionnel par la quinone Q_B , vers le transport intermédiaire d'électrons entre les deux photosystèmes. Le P680 possède à ce moment une charge positive dont le potentiel oxydant est suffisamment élevé pour tirer un électron du donneur primaire, une tyrosine (anciennement nommée Z^+), jusqu'à induire le clivage de molécules d'eau en oxygène et en protons. En fait, ce clivage se déroule à l'intérieur d'un mécanisme à quatre étapes (Kok *et al.*, 1970, Renger, 1988). Les protons libérés à cette occasion génèrent une partie du gradient électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP (Ort et Good, 1988).

De façon plus précise, c'est un assemblage de huit atomes de manganèse et d'oxygène (quatre chacun) qui constituerait l'unité responsable de l'emmagasiner d'équivalents de charges positives permettant le clivage de deux molécules d'eau (Rutherford, 1989). Les ions Mn^{+2} sont situés dans le complexe de dégagement d'oxygène (CDO) qui comprend, outre les protéines du centre réactionnel, trois protéines (de 33, 23 et 17 kDa) situées hors de la membrane thylacoïdienne. Le rôle de la protéine de 33 kDa serait de stabiliser l'assemblage d'ions Mn^{+2} , bien qu'il soit possible de retirer cette protéine en conservant une certaine activité de dégagement d'oxygène (en présence de 1 mM $CaCl_2$ par exemple). Quant aux protéines de 23 et 17 kDa, elles ne sont pas liées à l'assemblage d'ions Mn^{+2} , mais sont importantes au niveau de la régulation de la présence des cofacteurs Ca^{+2} et Cl^- dans le CDO (Ghanotakis et Yocum, 1990). Elles sont relarguées les premières lors de stress salins, ce qui montre leur situation périphé-

que dans le CDO, bien que leur localisation exacte les unes par rapport aux autres demeure sujet à discussion (Beauregard et Popovic, 1988).

Les complexes pigments-protéines collecteurs de lumière (CCL) comprennent des apoprotéines de masses moléculaires variant entre 20 et 30 kDa. Les CCL contribuent pour à peu près la moitié des chlorophylles et des protéines présentes dans les membranes thylacoïdiennes (Thornber, 1986). Comme leur nom l'indique, les CCL visent à absorber la lumière et à transmettre cette énergie quantique au centre réactionnel du PS II. Cependant, certaines conditions lumineuses peuvent induire une migration de certaines apoprotéines le long de la membrane thylacoïdienne jusqu'au PS I. C'est ce qui se produit dans les transitions état 1 - état 2, phénomène dont nous reparlerons plus loin. Il semble que les apoprotéines CP23 soient plus sujettes à cette migration (Staehelin et Allen, 1990).

Finalement, un petit mot sur des protéines intrinsèques, liées au noyau du PS II, qui contiennent le cyt b_{559} . Ces deux protéines, de 9 et 4,5 kDa, sont codées dans le génome chloroplastique (Ghanotakis et Yocum, 1990). Quant au cyt b_{559} , sa fonction, bien que spéculative, serait liée à sa participation au transport cyclique des électrons autour du PS II, ce qui permettrait une plus grande dissipation d'énergie lors de stress (Samson et Fork, 1991).

A la sortie du complexe du PS II, la quinone Q_B est doublement réduite, ayant accumulé deux électrons. Simultanément, celle-ci se charge de deux protons en provenance du stroma. La plastoquinol (PQH_2) formée diffuse dans la membrane thylacoïdienne jusqu'au complexe du cyt b_6-f (Mitchell *et al.*, 1990). Ce complexe enzymatique, de type oxydoréductase, accepte les électrons de la PQH_2 . En même temps, la PQH_2 libère ses protons dans le lumen, ce qui génère une partie du gradient électrochimique de protons (Malkin, 1988). Le complexe des cyt b_6-f comprend 4 sous-unités protéiques: un cytochrome de type c (le cyt f de 33 kDa), un de type b (le cyt b_6 de 23 kDa), un complexe Fe-S de Rieske (20 kDa) et une protéine de 17 kDa (chez l'épinard, Malkin, 1988). Par la suite, les électrons sont dirigés vers la plastocyanine (PC). La PC est une protéine cuivrique monomérique d'environ 10,5 kDa; la PC de l'épinard constituerait une exception avec ses deux monomères de 10,5 kDa (Droppa et Horvath, 1990). Il semble que la plastocyanine diffuserait du côté luminal de la membrane thylacoïdienne afin de rejoindre le PS I. La libération de l'électron permettrait de réduire le PS I excité.

L'ATP-synthétase constitue le dernier grand complexe protéique présent sur la membrane thylacoïdienne. Cette enzyme est formée de deux sous-unités, elles-mêmes composées de plusieurs peptides. La sous-unité externe (FC_1), plus précisément les polypeptides β , est responsable de la synthèse proprement dite de l'ATP, à partir d'ADP et de P_i . La sous-unité FC_0 est constituée de polypeptides transmembranaires formant un

passage pour les protons situés du côté luminal de la membrane (Nelson, 1987). Ce passage de protons permet de harnacher l'énergie (c'est M. Bourassa qui serait content de l'expression) contenue dans le gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne. Il induirait un changement de conformation d'un polypeptide, ce qui permettrait la synthèse d'ATP (Junge, 1989). Ce gradient trouve ses sources à la libération de protons consécutive à l'hydrolyse de l'eau par le PS II ainsi qu'au transport de protons lié au transport d'électrons au niveau de la plastoquinone (Ort et Good, 1988), ce dont nous avons discuté antérieurement. Les molécules d'ATP synthétisées au cours de ce processus sont utilisées dans la phase biochimique de la photosynthèse ainsi que dans les différentes réactions métaboliques de la cellule végétale.

1.2.3 La phase biochimique

La phase biochimique vise à fixer le CO_2 atmosphérique à l'intérieur de composés organiques qui, ultimement, serviront de réserves énergétiques pour les organismes autotrophes. Cette voie métabolique, découverte au tournant des années cinquante suite aux travaux de Calvin, Benson et Bassham, constitue certes une des plus importantes de la nature.

La réaction enzymatique de base réside dans la production de 2 molécules de 3-phosphoglycérate à partir du CO_2 et d'une molécule de ribulose-1,5 diphosphate (figure

4). L'enzyme responsable de cette réaction est la ribulose-1,5 diphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco). Nous verrons un peu plus loin l'importance de la fonction oxygénase. Cette enzyme, d'une masse moléculaire d'environ 550 kDa, possède 2 sous-unités oligomériques. Les 8 polypeptides de la petite sous-unité (12 à 18 kDa) sont codés au niveau du noyau, alors que les 8 polypeptides de la grosse sous-unité (50 à 55 kDa) sont codés dans le génome chloroplastique (Andrews et Lorimer, 1987). La Rubisco peut représenter jusqu'à 15 % des protéines totales de la cellule végétale, ce qui en fait une des protéines les plus abondantes sur terre (Ellis, 1979). La Rubisco est activée par la lumière, selon le mécanisme dont je discuterai un peu plus loin (Campbell et Ogren, 1990).

La réaction initiale ne suffit pas à elle seule à expliquer comment les 6 carbones des hexoses formés parviennent du CO_2 atmosphérique. Pour rendre compte de ce processus, Benson et Calvin ont proposé un mécanisme cyclique, dans lequel une molécule de ribulose-1,5 diphosphate est régénérée pour chaque molécule de CO_2 réduite (Benson et Calvin, 1950). C'est le cycle de Calvin-Benson, tel que schématisé à la figure 4. Cet ensemble de réactions nécessite la présence de molécules de NADPH et d'ATP formées au cours de la phase physico-chimique de la photosynthèse. A chaque tour du cycle, une molécule de glucose-6 phosphate est produite, qui sera transformée ultimement en un glucide de réserve, l'amidon. Il est à noter qu'il n'existe que très peu de glucose libre dans les cellules végétales (Lehninger, 1981).

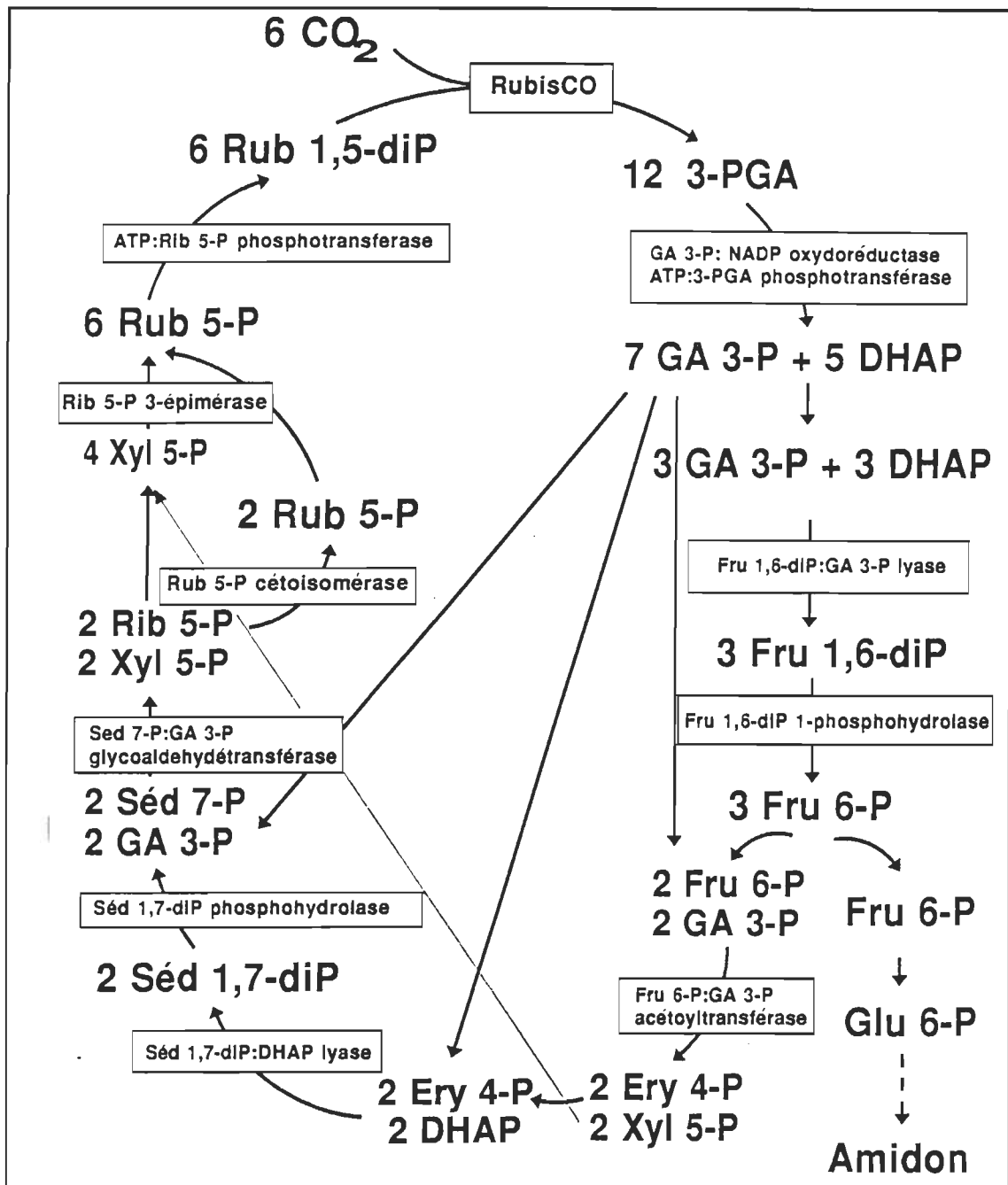


Figure 4: Le cycle de Calvin-Benson. P: Phosphate, 3-PGA: 3-Pglycérate, GA 3-P: Glycéraldéhyde 3-P, DHAP: DihydroxyacétoneP, Fru 1,6-diP: Fructose 1,6-diP, Glu 6-P: Glucose 6-P, Ery-4-P: Erythrose 4-P, Xyl 5-P: Xylulose 5-P, Sed 1,7-diP: Sédoheptulose 1,7-diP, Rib 5-P: Ribose 5-P, Rub 1,5-diP: Ribulose 1,5-diP.

Depuis la découverte de ce cycle, cette partie de la photosynthèse était désignée sous le vocable de phase obscure. Des progrès récents ont cependant permis de montrer que l'activité de plusieurs des enzymes impliquées dans ce processus était régulée par la lumière (Anderson, 1985).

L'activité de la Rubisco est elle-même dépendante de la lumière, puisqu'un inhibiteur, le phospho-1 carboxy-2 arabinitol, présent en grandes quantités aux faibles intensités lumineuses et à l'obscurité, régularise ses fonctions photosynthétiques (Seemann *et al.*, 1990). Ce composé se révèle structuralement très près de l'intermédiaire de l'état de transition synthétisé lors de la fixation du CO₂ sur le ribulose 1-5-diphosphate, ce qui lui permet de compétitionner avec les réactifs usuels pour le site actif de l'enzyme. La synthèse et la dégradation de ce composé sont dépendantes de l'intensité lumineuse et seraient liées au pH stromatique (Campbell et Ogren, 1990 a et b). Le mécanisme exact d'activation demeure toutefois sujet à discussion.

Plusieurs enzymes du cycle de Calvin-Benson sont activées par un mécanisme mettant en cause la lumière. C'est le cas de la glycéraldéhyde 3-phosphate:NADP oxydoréductase, de la fructose 1,6-diphosphate 1-phosphohydrolase, de la sédoheptulose 1,7-diphosphate 1-phosphohydrolase et de l'ATP:ribulose 5-phosphate 1-phosphotransférase, ainsi que de certaines protéines de translocation des assimilats vers le cytoplasme,

comme la NADPH:malate oxydoréductase, *via* le système de la ferrédoxine/thiorédoxine (Scheibe, 1990).

Le système de la ferrédoxine/thiorédoxine est impliqué dans la réduction de ponts disulfure à l'intérieur des protéines-cibles, ce qui, tout dépendant de la protéine, l'activerait ou l'inhiberait (Scheibe, 1990). La thiorédoxine est activée par l'arrivée d'électrons (via la ferrédoxine du système de transport d'électrons) ou par l'oxygène produit par le PS II lors de la phase physico-chimique de la photosynthèse (Scheibe, 1990). Ce mécanisme peut être qualifié de direct (figure 5A).

Il en existe un second, à deux temps, où une phosphatase ou une kinase serait dans un premier temps activée, et par la suite, modifierait le degré de phosphorylation d'une seconde enzyme-cible (figure 5B), induisant ainsi une variation de l'activité de celle-ci (Anderson, 1985).

Ainsi, le transport d'électrons de la phase physico-chimique se retrouve, *via* ce système, directement responsable de l'activation enzymatique de la phase biochimique de la photosynthèse. Voilà pourquoi il faudrait bannir l'expression phase sombre lorsque l'on se réfère à la phase biochimique de la photosynthèse, puisque la lumière y joue un rôle certain.

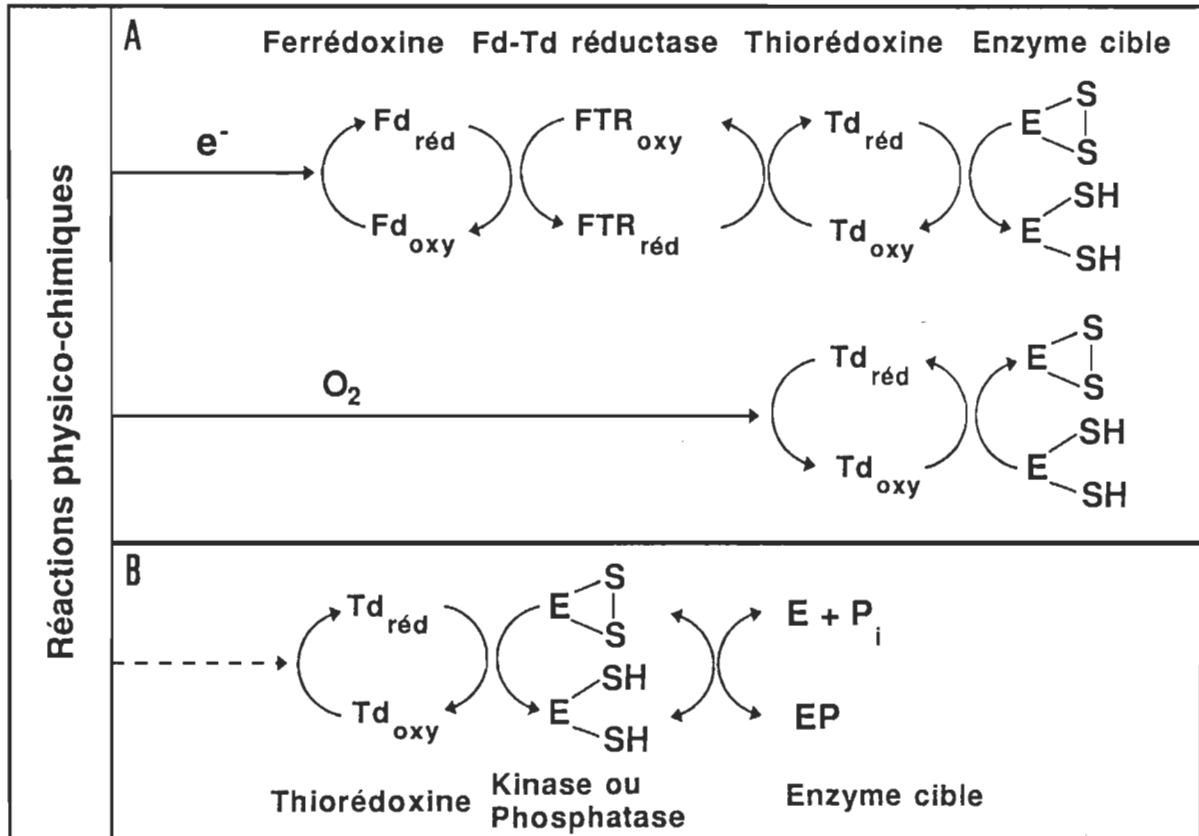


Figure 5: Mécanismes de la réduction d'une enzyme-cible catalysée par le système chloroplastique de la thiorédoxine. A- Mécanisme direct, B- Mécanisme indirect (D'après Scheibe, 1990).

Je me permets un petit aparté afin de souligner que la fixation du CO_2 sur un composé à 3 atomes de carbone (le 3-phosphoglycérate) n'est pas la seule voie métabolique utilisée par les plantes afin de fixer le CO_2 atmosphérique. Chez certaines plantes, telles le maïs et la canne à sucre, le premier composé comportant le CO_2 est une molécule à quatre atomes de carbone, l'oxaloacétate. C'est pourquoi les plantes comme le maïs sont dites à photosynthèse en C_4 , alors que les autres sont dites à photosynthèse en C_3 .

Une coopération entre les deux types de cellules chez les plantes en C_4 est nécessaire, afin de permettre la translocation du CO_2 fixé dans les cellules mésophylliennes (plus près de la surface de la feuille) vers les cellules périfasciculaires (entourant le système vasculaire de la feuille, interne), où se produit le cycle de Calvin-Benson (Lehninger, 1981). L'avantage de ce type de voie métabolique réside dans le fait que la phosphoénolpyruvate carboxylase, l'enzyme responsable de la fixation du CO_2 atmosphérique dans les cellules mésophylliennes, possède une très grande affinité pour le CO_2 . Ceci permet d'enrichir la concentration en CO_2 dans les cellules périfasciculaires, augmentant d'autant l'efficacité de la fonction carboxylase de la Rubisco (Hatch, 1987). Notons au passage que des études récentes ont permis d'établir que l'activité de la phosphoénolpyruvate carboxylase était elle aussi dépendante de la lumière, probablement grâce à un mécanisme similaire à celui observé pour les enzymes du cycle de Calvin-Benson (Jiao et Chollet, 1992).

Cette efficacité moindre de la Rubisco pour fixer le CO_2 chez les plantes à photosynthèse en C_3 vient de la compétition pour le site actif de la part de l' O_2 . La Rubisco, de par sa fonction oxygénase, peut catalyser la réaction entre le ribulose-1,5 diphosphate, le même substrat que dans la fixation du CO_2 , et l' O_2 pour former du 3-phosphoglycérate et du glycolate (Zelitch, 1964). Cette réaction constitue un autre puits de consommation d'oxygène par la plante. Le glycolate formé est par la suite métabolisé lors de la photorespiration. Cette voie métabolique met en relation plusieurs réactions biochimiques

sisés dans le chloroplaste, le peroxyosome et la mitochondrie (Ogren, 1984). Sa fonction exacte au sein de la cellule végétale est encore le sujet de débats. La photorespiration pourrait servir de mode de dissipation énergétique dans les cas de stress, puisqu'elle permet de détoxifier la cellule du peroxyde et d'ions O_2^- , sous-produits de la phase physico-chimique (Ogren, 1984). Cette notion de consommation d'oxygène à deux niveaux de la photorespiration nous sera aussi utile à l'intérieur de ce travail.

1.2.4 Les états de transition (état 1 - état 2)

Comme nous l'avons vu lors de la description de la phase physico-chimique, chacun des deux photosystèmes possède ses propres complexes pigments-protéines responsables de l'absorption lumineuse. De plus, la séparation de charges au sein des deux centres réactionnels s'effectue optimalement à des longueurs d'onde différentes selon le photosystème (à 680 nm pour le PS II et à 700 nm pour le PS I). Ainsi, chez la plupart des algues photosynthétiques et des plantes supérieures, l'absorption lumineuse à une longueur d'onde donnée résulte en un débalancement de l'excitation entre les deux photosystèmes. Puisque le transport d'électrons entre l'eau et le CO_2 requiert une opération en série des PS II et PS I, il est nécessaire, afin de maximiser l'efficacité, que les deux photosystèmes opèrent à des taux appropriés. Les transitions d'état, induites par une surexcitation de l'un ou l'autre des deux photosystèmes, permettent, dans l'ordre de quelques minutes, de redistribuer l'énergie entre les deux systèmes (pour une revue, voir

Fork et Satoh, 1986). Ce phénomène, découvert de façon indépendante par Murata (1969) chez l'algue rouge et par Bonaventura et Myers (1969) chez l'algue verte, se retrouve dans tous les organismes photosynthétiques.

Une surexcitation du PS I, par une lumière bleue ou rouge (chez les algues rouges ou les cyanobactéries), ou par une lumière dans le rouge lointain (chez les algues vertes et chez les plantes) induit l'état 1. Dans ces conditions, on remarque une hausse de la fluorescence associée au PS II, ce qui peut être interprété, selon l'école de pensée, par une augmentation de la section efficace des complexes collecteurs de lumière du PS II ou par un retard dans le transfert d'énergie entre le PS II et le PS I. L'état 2 se caractérise par une diminution de la fluorescence associée au PS II lorsque les algues vertes ou les plantes sont illuminées par une lumière rouge ou bleue (orange chez les cyanobactéries).

D'un point de vue moléculaire, la phosphorylation d'un complexe pigments-protéines mobile constitue le mécanisme régissant les états de transition *in vivo* (Canaani *et al.*, 1984). La figure 6 illustre l'aspect moléculaire des états de transition. Chez les plantes supérieures, l'état 2 est induit suite à une illumination à des longueurs d'onde inférieures à 670 nm. Dans ces conditions, le PS II est préférentiellement excité. Les

électrons provenant du PS II se rendent au bassin de plastoquinones (PQ), réduisant ces molécules en plastoquinols (PQH₂). Le rapport PQ/PQH₂ diminue constamment puisque le PS I ne peut suffir à réoxyder les molécules de PQH₂.

En-deçà d'une certaine valeur, une kinase est activée, ce qui permet la phosphorylation du complexe collecteur de lumière mobile du PS II (probablement une apoprotéine de 23 kDa (Staehelin et Allen, 1990)). Soit dit en passant, le complexe des cytochromes

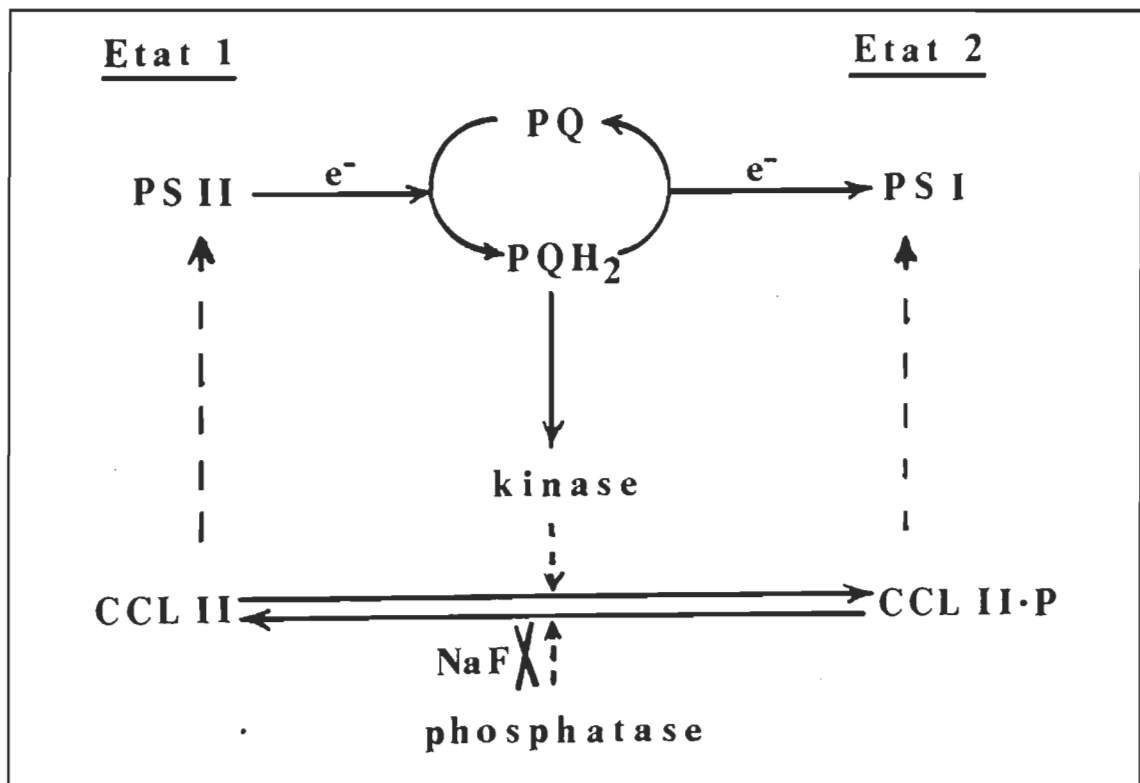


Figure 6: Mécanisme moléculaire régissant les états de transition. Le NaF peut être utilisé afin d'inhiber l'activité de la kinase, ce qui empêche la transition de l'état 2 vers l'état 1.

b₆-f pourrait aussi être impliqué dans l'activation de la kinase (Bennett *et al.*, 1988). Cette phosphorylation des CCL II mobiles induirait un désempilement partiel des grana, ce qui faciliterait la migration des CCL II à l'intérieur de la membrane thylacoïdienne jusqu'au PS I. L'énergie absorbée par les CCL II mobiles est ainsi drainée vers les centres réactionnels du PS I, ce qui permet une distribution balancée de l'énergie entre les deux photosystèmes (Williams et Allen, 1987).

Chez les plantes, le retour vers l'état 1 est initié lors d'une illumination à des longueurs d'onde supérieures à 690 nm.. Dans ces conditions, le PS I absorbe beaucoup plus que le PS II, d'où un débalancement de l'énergie d'excitation en faveur du PS I. La kinase n'est plus activée et une phosphatase, en enlevant le(s) groupement(s) phosphate(s) du CCL II, permet la migration de celui-ci vers le PS II. Ainsi, un réajustement de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes est effectué, ce qui assure une activité photosynthétique maximale.

1.3 La photoinhibition

1.3.1 Définitions et généralités

Dans un premier temps, je voudrais définir les termes que j'utiliserai au cours des prochaines lignes, définitions tirées de l'article de Powles (1984).

L'acclimatation est le potentiel de changement dans la composition et la fonction de l'appareil photosynthétique afin d'utiliser maximalelement et/ou de supporter les variations de l'énergie lumineuse autant en quantité qu'en qualité. Quant à la photoinhibition, elle consiste en une réduction de la capacité photosynthétique, induite par l'illumination à la lumière visible (400-700 nm) ou ultraviolette, indépendamment d'une éventuelle variation de la concentration en pigments. Dans les feuilles, la photoinhibition n'est pas reliée à une limitation de la diffusion du CO₂ suite à une fermeture des stomates. Elle est inversement liée à la capacité de réparer les dommages causés par la lumière lorsque les variations lumineuses dépassent les capacités d'acclimatation. Finalement, le stage ultime de l'interaction entre la lumière et les végétaux est la photooxydation où une destruction des pigments photosynthétiques survient, suite à une trop longue exposition à de trop hautes intensités lumineuses. Cette destruction est dépendante de la concentration d'O₂. Elle suit habituellement la photoinhibition.

Les premières études systématiques de l'effet des hautes intensités lumineuses sur l'activité photosynthétique ont été effectuées par Myers et Burr en 1940. Les travaux ultérieurs ont porté sur des organismes entiers tels que les feuilles, mais des mécanismes de réparation rendaient difficile l'interprétation des stress de haute intensité lumineuse à ce niveau d'organisation. C'est ce qui a amené Jones et Kok (1966 a et b) à travailler avec des chloroplastes. Leurs travaux de pionniers seront suivis par une foule d'autres,

ce qui, à l'heure actuelle, rend l'étude des stress lumineux de haute intensité un des domaines de recherche les plus florissants en photosynthèse.

Tous les organismes photosynthétiques, du phytoplancton (Belay, 1981) aux plantes supérieures (voir la suite...), en passant par les algues (Herbert, 1990, Neale, 1987) et les cyanobactéries (Paerl, 1984) sont sujets à la photoinhibition. Leur degré de tolérance varie d'une espèce à l'autre, est dépendant de leurs conditions de croissance (Anderson et Osmond, 1987), de la présence d'un autre stress (Boyer *et al.*, 1987, Ludlow, 1987 et Oquist *et al.*, 1987), etc. L'effet d'un traitement photoinhibiteur varie à l'intérieur même des différentes assises cellulaires d'une feuille, à cause des propriétés optiques intrinsèques de celle-ci. En effet, Powles et Björkman (1982) ont clairement démontré qu'un traitement photoinhibiteur dirigé vers une face foliaire plutôt que l'autre, affectait de manière plus importante les cellules de cette face - tel que révélé par la fluorescence à 77 K- que les cellules de la face opposée.

1.3.2 Mécanismes de la photoinhibition

Dès les premiers travaux portant sur la photoinhibition, Jones et Kok (1966 b) ont démontré que le spectre d'action de ce phénomène était intimement lié au spectre d'absorption de la chlorophylle, une idée intuitivement acceptable. Les travaux

ultérieurs, autant *in vivo* qu'*in vitro*, ont abondamment confirmé que les dommages photoinhibiteurs mettaient en cause les chloroplastes.

Suite au traitement photoinhibiteur, le transport d'électrons est diminué (Critchley, 1981, Ogren et Oquist, 1984). Ceci induit par le fait même une baisse du dégagement d'O₂ photosynthétique (Björkman *et al.*, 1988, Samuelsson *et al.*, 1985) et une inhibition du taux de fixation du CO₂ (Powles *et al.*, 1979, Ogren *et al.*, 1984). L'utilisation *in vitro* de modulateurs de l'activité photosynthétique a permis de cerner la cible primaire des dommages photoinhibiteurs au niveau du PS II (Critchley, 1981).

Mais ce sont les mesures de fluorescence qui ont permis d'identifier que les lésions causées par la photoinhibition étaient dirigées principalement vers le PS II. Des diminutions importantes du rendement quantique et des cinétiques de fluorescence ont été observées chez des feuilles intactes (Critchley et Smillie, 1981, Powles et Björkman, 1982), des algues (Whitelam et Codd, 1984, Kyle *et al.*, 1984), des chloroplastes intacts (Barényi et Krause, 1985) et des thylacoïdes (Cleland et Critchley, 1985, Krause *et al.*, 1985, Nedbal *et al.*, 1986) suite aux traitements photoinhibiteurs. L'universalité du phénomène, alliée aux mesures de fluorescence, montre que la baisse de l'activité photosynthétique n'est pas due à la fermeture des stomates (puisque les algues sont touchées), ni dépendante de contributions cytoplasmique ou mitochondriale (puisque les

chloroplastes isolés sont affectés), mais est bien causée par des dommages à la membrane thylacoïdienne.

Les spectres d'émission de fluorescence à 77 K peuvent montrer la localisation d'éventuels dommages membranaires, puisque la longueur d'onde d'émission du PS II se révèle différente de celle du PS I (Kyle, 1987). Suite au traitement photoinhibiteur, on observe une diminution des bandes d'émission associées au PS II *in vivo* chez l'algue verte *Chlamydomonas* (Kyle, 1987) et chez le laurier rose (*Nerium olander*, Björkman *et al.*, 1981), de même qu'*in vitro* chez des thylacoïdes d'épinard (Cleland et Critchley, 1985). Par contre, l'intensité de la bande d'émission associée au PS I ne fluctue pas. Powles et Björkman (1982) ont montré que le phénomène n'est pas relié à une redistribution d'énergie entre les photosystèmes. On doit cependant noter que la fluorescence associée au PS I subit une baisse lorsque le traitement est prolongé chez les thylacoïdes (Cleland et Critchley, 1985) et les chloroplastes (Barényi et Krause, 1985). Le site primaire d'action des hautes intensités lumineuses se révèle donc situé au niveau du PS II.

L'utilisation de modulateurs de l'activité photosynthétique et de marqueurs spécifiques des protéines a permis de localiser plus précisément le site des dommages (Kyle, 1987). Ainsi, l'activité de transport d'électrons entre l'eau et le dichlorophénolindol (DPIP) mime l'activité totale de la chaîne de transport d'électrons. Cette activité est réduite suite au traitement photoinhibiteur (figure 7, Ohad *et al.*, 1984). Par contre,

l'activité du PS I (tétraméthylphénylènediamine vers le methylviologène) n'est pas affectée (Ohad *et al.*, 1985), et celle du PS II séparé de la protéine Q_B (eau vers le silicomolybdate (Girault et Galmiche, 1974)) s'avère légèrement diminuée (figure 7).

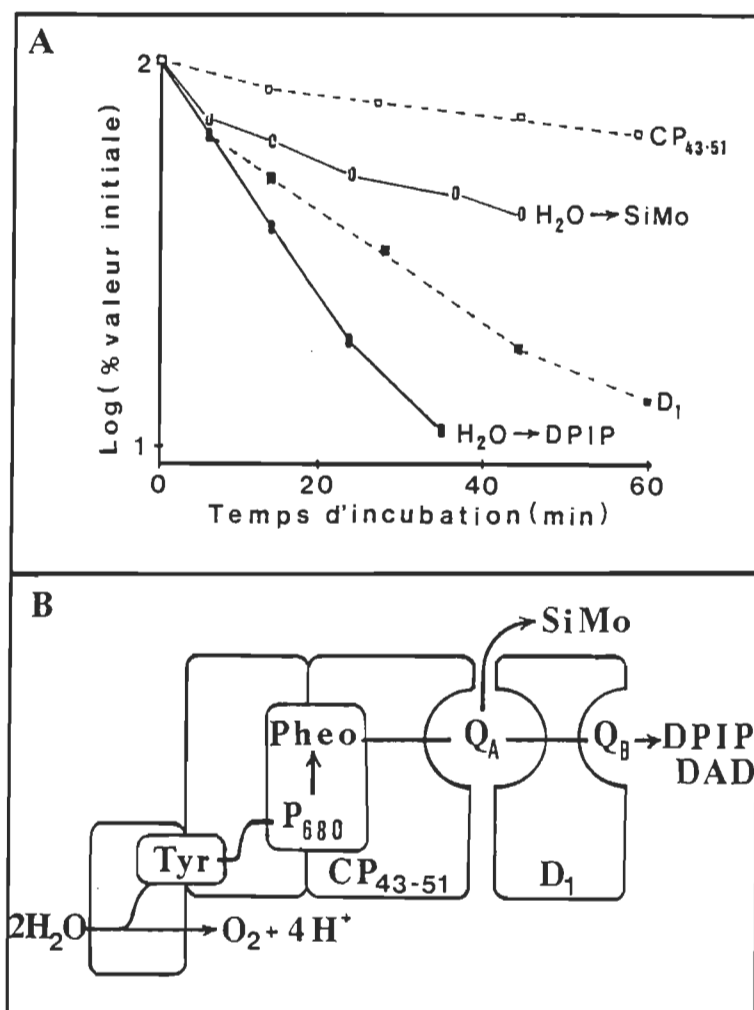


Figure 7: A- Effet de la photoinhibition sur l'activité de transport d'électrons et la présence de protéines marquées de la membrane thylacoïdienne. (D'après Ohad *et al.*, 1985). B- Représentation schématique du centre réactionnel du PS II et du transport d'électrons. (D'après Kyle, 1987; note: cette représentation n'est plus valable, le centre réactionnel étant composé des protéines D1-D2 (voir figure 3)).

La diminution de l'activité dépendante de la protéine Q_B est directement corrélée avec la perte de cette protéine dans la membrane thylacoïdienne (figure 7) et de la perte de sites de liaisons de l'atrazine (Kyle *et al.*, 1984). Cette diminution de la présence de la protéine Q_B pré-marquée n'est pas observée dans le cas de la protéine de 51 kDa (figure 7). De façon générale, le haut taux de recyclage de la protéine Q_B chez les feuilles soumises à un stress de hautes intensités lumineuses supporte l'hypothèse que le site primaire de la photoinhibition est localisé au niveau de la protéine Q_B (Mattoo *et al.*, 1984, Reisman et Ohad, 1986).

Néanmoins, il est à noter que, chez des chloroplastes isolés et chez des cyanobactéries, l'activité indépendante de Q_B peut elle aussi être affectée, ce qui situerait le site primaire au niveau du centre réactionnel lui-même (Cleland et Critchley, 1985, Tytler *et al.*, 1984). Cette interprétation est supportée par des mesures d'absorption à 320 nm, liées à la photoréduction de la molécule Q_A , qui montrent que la photoréduction de Q_A est inhibée suite à la photoinhibition (Cleland *et al.*, 1986, 1987). Un troisième site de dommages, placé en aval du PS II, a été observé chez des particules de PS II dont les capacités de dégagement d' O_2 ont été inhibées, suite à un traitement à l'hydroxylamine (Callahan et Cheniae, 1985, Callahan *et al.*, 1986), à un lavage dans un tampon Tris (Eckert *et al.*, 1991) ou l'enlèvement des ions Cl^- (Styring *et al.*, 1990). Le site peut même varier selon les conditions d'isolation et le statut du PS II (Eckert *et al.*, 1991).

En résumé, il est certain que le site primaire de dommages causés par la photoinhibition est localisé au niveau du PS II, mais son exact emplacement suscite encore une controverse importante. La méthode employée pour induire la photoinhibition, à savoir *in vivo* ou *in vitro* pourrait en être responsable. Barber et Andersson (1992) ont en effet montré que les dommages reliés au côté donneur du PS II peuvent survenir en conditions anaérobiques alors que ceux reliés au côté accepteur du PS II sont dépendents de la présence d'oxygène.

1.3.3 Photoinhibition et autres stress environnementaux

De façon générale, la présence d'un stress environnemental réduit les capacités photosynthétique et d'acclimatation (en diminuant l'efficacité des mécanismes de réparation par exemple) d'une plante; l'adjonction d'un stress lumineux augmentera donc les effets néfastes du premier stress sur la plante et *vice-versa*.

1.3.3.1 Et basses températures ($T < 10^{\circ}\text{C}$)

Etant donnée la saison végétative relativement courte qui prévaut dans certaines régions du globe (dont la nôtre), les communautés végétales y croissant sont sujettes à une exposition combinée de ces deux stress environnementaux à un moment ou l'autre de leur développement. En fait, les basses températures, en diminuant l'efficacité

photosynthétique, prédisposent l'appareil photosynthétique à une sur-énergisation, laquelle apparaît rapidement lors de stress de hautes intensités lumineuses (Oquist *et al.*, 1987).

Dans un tel type d'études, plusieurs paramètres doivent être pris en considération: (i) Le degré de tolérance (ou de sensibilité) que possède la plante aux basses températures. Certaines plantes, sont plus susceptibles que d'autres à une exposition aux basses températures; ainsi, la présence de lumière pourrait affecter irrémédiablement l'appareil photosynthétique. Ceci n'est pas étranger au fait que les plantes à photosynthèse en C_4 les plus septentrionales soient des plantes d'ombre (Long, 1983); (ii) La baisse de température que subit la plante. Les températures sous le point de congélation et la lumière, même d'intensité modérée, peuvent produire un effet photoinhibiteur chez des plantes résistantes à la fois aux basses températures et aux hautes intensités lumineuses. Un bon exemple est rapporté par Strand et Oquist (1985) chez le pin écossais; (iii) La durée d'exposition aux basses températures et/ou aux hautes intensités lumineuses; (iv) Les effets des basses températures sur les processus alternatifs de dissipation énergétique. Ces processus métaboliques ou biophysiques comprennent la photorespiration, le système enzymatique de la superoxyde dismutase (SOD), la présence de caroténoïdes, etc.; et (v) Les effets des basses températures sur les mécanismes de réparation.

Dans les faits, les effets des basses températures sur les mécanismes de réparation sont d'une importance majeure. Ces mécanismes sont liés à la capacité que possède la plante de synthétiser de nouvelles protéines, de les insérer dans la membrane, de les transporter latéralement jusqu'au site de bris et enfin, d'enlever la protéine endommagée. Kyle et Ohad (1986) n'hésitent pas à conclure que l'effet photoinhibiteur net résulte de la balance entre les dommages causés et la capacité de recouvrement. Une grande partie de ces mécanismes de recouvrement requiert une activité enzymatique; or, cette activité est reconnue pour décroître à basse température (Lehninger, 1981). De plus, les basses températures diminuent le degré de fluidité des lipides membranaires (Chapman, 1975), ce qui limite la diffusion des protéines synthétisées *de novo*. Ainsi, les basses températures, en diminuant l'efficacité des mécanismes de réparation, vont augmenter l'effet des stress de haute intensité lumineuse (Greer *et al.*, 1986, Oquist *et al.*, 1987).

1.3.3.2 Et hautes températures ($T > 30\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Dans le cas des stress de hautes températures, la lumière peut exercer trois effets différents, selon son intensité.

Les hautes intensités lumineuses ($2\ 000\ \mu\text{E m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) décroissent la tolérance des plantes aux hautes températures (entre 30 et $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ chez *Siratro*, Ludlow et Björkman, 1984). De la même façon, les hautes températures diminuent le seuil d'acclimatation

aux hautes intensités lumineuses (Ludlow, 1987). A la limite, une augmentation trop importante de la température peut mener à la photooxydation beaucoup plus rapide des pigments pour une intensité lumineuse donnée (Greer *et al.*, 1986). Finalement, les hautes intensités lumineuses exacerbent les effets d'un autre stress, par exemple un stress hydrique (entre 30 et 42 °C chez Siratro, Ludlow et Bjorkman, 1984).

De faibles intensités lumineuses ($125 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) préviennent les dommages causés par les hautes températures lors de courtes expositions (entre 5 et 10 minutes) (Schreiber et Berry, 1977). Cette lumière incidente permettrait de conserver un équilibre ionique, ce qui stabiliserait la membrane thylacoïdienne. Une très faible intensité lumineuse ($20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), quant à elle, augmente le taux de recouvrement suite à des dommages causés par les hautes températures, comparativement à l'obscurité. La lumière induirait ici les mécanismes de recouvrement plutôt que de les régulariser (Ludlow, 1987).

1.3.3.3 Et déficit hydrique

Le stress hydrique représente probablement le stress environnemental qui, par lui-même, entraîne les plus importantes conséquences pour la photosynthèse. Sa combinaison avec la photoinhibition ne peut donc que causer des effets dévastateurs sur l'activité photosynthétique. Lorsqu'une plante est soumise à un stress hydrique, deux grands effets sont retrouvés: (i) les stomates, responsables des échanges d'eau et des gaz se

referment, afin d'éviter des pertes hydriques trop importantes. Ceci a aussi pour effet de diminuer la dissipation de la chaleur hors de la feuille. (ii) au même moment, une diminution de l'activité photosynthétique, conséquence de la limitation de l'entrée du CO_2 dans la feuille, est observée. L'énergie absorbée doit donc être dissipée sous d'autres modes que l'activité photochimique. On observe à ce moment, une augmentation de l'énergie dissipée sous forme de chaleur ou de lumière (fluorescence).

Ainsi, lors d'un stress hydrique, le surplus de chaleur dissipée par l'appareil photosynthétique est difficilement rejeté dans l'environnement (à cause de la fermeture des stomates), ce qui cause une augmentation de la température interne de la feuille. Si cette température atteint des niveaux suffisamment élevés pour diminuer l'activité enzymatique, des dommages importants sont occasionnés à la feuille. Par conséquent, la photoinhibition, en augmentant la demande de dissipation énergétique sous forme de chaleur, exacerbe les effets du stress hydrique (Boyer *et al.*, 1987).

1.3.3.4 Et herbicides

Le duo lumière et herbicides constitue certes un des moyens les plus couramment utilisés afin de contrôler la végétation. Trois grands mécanismes d'action de cette paire de contraintes abiotiques peuvent être distingués selon van Rensen *et al.* (1984): (i) L'inhibition de la chaîne de transport d'électrons représente le premier mécanisme.

Suite à l'inactivation de la chaîne, il s'ensuit une sur-énergisation des photosystèmes, ce qui mène ultimement à une photodégradation des pigments. La grande majorité de ces herbicides, dont l'atrazine s'avère un bon exemple, se fixe au niveau de la protéine Q_B , empêchant le transfert d'électrons jusqu'au bassin de plastoquinones; (ii) L'inhibition de la synthèse de caroténoïdes, par des composés comme le norflurazon, constitue le second mécanisme (Mayfield *et al.*, 1986). La désaturation du phytoène, un précurseur de la β -carotène et des xanthophylles, représente la réaction-cible de ce type d'inhibiteurs. Ainsi, l'absence de ces caroténoïdes enlève une protection supplémentaire à l'appareil photosynthétique; et (iii) Le troisième mécanisme est relié au bris de constituants cellulaires, y compris chloroplastiques. La lumière induit chez ces composés, dont les bipyridyles constituent un bon exemple, la formation de radicaux ou d'espèces d' O_2 toxiques pour la membrane cellulaire.

1.3.4 Modes de protection

Il existe trois grandes catégories de modes de protection, chacun étant relié à un niveau d'organisation de la plante: (i) les modes biophysiques se situent particulièrement au niveau de la membrane thylacoïdienne; (ii) les modes métaboliques requièrent des processus se déroulant au niveau chloroplastique; et (iii) les modes morphologiques font appel à des mécanismes cellulaires, voire au niveau de la plante entière. Au cours des

prochaines lignes, je présenterai plus en détail chacun des modes, en suivant *grosso modo* la classification qu'a établie Powles (1984).

Les modes biophysiques sont reliés aux mécanismes d'échange d'énergie entre les différents pigments de l'appareil photosynthétique ou aux modes de désexcitation de ceux-ci.

Une des premières fonctions des caroténoïdes est d'absorber la radiation incidente et de la transmettre vers le centre réactionnel des photosystèmes, augmentant d'autant le domaine d'activité de l'appareil photosynthétique (Cogdell, 1978). Outre cet aspect, les caroténoïdes possèdent aussi une fonction protectrice, puisqu'ils interagissent avec les molécules de chlorophylle dans l'état triplet ou les molécules d'O₂ dans l'état singulet, deux espèces particulièrement réactives et potentiellement toxiques pour la membrane (Krinsky, 1978, Renger et Wolff, 1977). A cet égard, les expériences réalisées avec des plantes déficientes en caroténoïdes ont clairement démontré leur rôle essentiel dans la prévention de la photooxydation des pigments et des protéines (Mayfield *et al.*, 1986, Thomas et Matile, 1988). Suite à cette interaction avec les molécules réactives, les caroténoïdes vont dissiper l'énergie sous forme de chaleur, ce qui constitue un mécanisme non-destructif de protection.

De façon particulière, B. Demmig et ses collaborateurs ont démontré le rôle important du cycle des xanthines sur la dissipation énergétique lors de stress lumineux (pour une revue voir Demmig-Adams et Adams, 1992). Lors d'un tel stress, les molécules de violaxanthine sont converties en zéaxanthine. Cette conversion est intimement corrélée avec l'atténuation de fluorescence que l'on peut relier aux mécanismes de dissipation thermique (Demmig *et al.*, 1987, Demmig-Adams *et al.*, 1990). Winter et Königer (1989) ont montré qu'en inhibant le cycle des xanthines, la susceptibilité des plantes aux stress lumineux était augmentée.

Outre son interaction avec les caroténoïdes, l' O_2 peut être réduit en acceptant les électrons en provenance du PS I, devenant ainsi un compétiteur à la formation du NADPH. Dans la réaction de Mehler, du nom du biochimiste ayant découvert cette réaction, l' O_2 ayant accepté un électron devient un radical libre, forme des radicaux hydroxyles toxiques, ou est transformé en peroxyde d'hydrogène (Robinson, 1988). Ces composés toxiques sont par la suite métabolisés via le système de la superoxyde dismutase, de la catalase ou de l'ascorbate peroxidase (Eltner, 1987, Salin, 1988). Ces enzymes se retrouvent particulièrement dans les peroxisomes, des organites situés à proximité des chloroplastes (Vaughn, 1985).

A première vue, on pourrait croire que la réaction de Mehler se révèle plutôt dangereuse pour la cellule, puisqu'elle mène à la formation d'espèces d' O_2 toxiques.

Mais, en regardant le métabolisme de l'O₂ dans son ensemble, il a été suggéré que la réaction de Mehler pouvait servir de mécanisme dissipant l'énergie, ce qui permettrait d'éviter la photoinhibition (Radmer et Kok, 1976). En effet, l'O₂ devient dans ces conditions un accepteur d'électrons, ce qui crée une activité photochimique accrue. Bien que ce mécanisme semble plausible chez certaines algues (Radmer et Kok, 1976), il se révèle plus ou moins efficace chez plusieurs espèces de végétaux afin d'éviter les effets négatifs de la photoinhibition (Osmond, 1981, Wu *et al.*, 1991).

La persistance de la fixation du CO₂, à tout le moins à un niveau minimal, se révèle nécessaire pour éviter, ou minimiser, les effets négatifs de la photoinhibition (Powles, 1984). En effet, un stress de hautes intensités lumineuses en absence de CO₂ mène à des dommages plus grands qu'en présence de CO₂, autant chez les plantes en C₃ qu'en C₄ (Cornic, 1976, Krause *et al.*, 1978, Powles *et al.*, 1980). L'explication de ce phénomène demeure cependant sujette à discussion. Une hypothèse veut qu'en maintenant la fixation de CO₂, l'appareil photosynthétique doit ainsi synthétiser de l'ATP et du NADPH, ce qui assure un certain flot d'électrons et prévient ainsi une sur-énergisation du PS II (Powles, 1984).

L'autre grande voie métabolique du carbone chez les plantes, la photorespiration, se retrouve au centre d'un autre mécanisme de protection. L'absence d'O₂ et de CO₂ augmente de beaucoup l'effet d'un traitement photoinhibiteur (Cornic, 1978, Osmond,

1981, Powles *et al.*, 1979). Dans ces conditions, il n'existe aucun accepteur terminal d'électrons; ainsi l'activité photochimique n'est pas assurée. Dans un article récent, Wu *et al.* (1991) ont montré que la photorespiration jouait un rôle plus important que la réaction de Mehler dans la protection contre la photoinhibition. Pour ces auteurs, le mécanisme n'est pas relié à la maintenance d'une activité photochimique. Il serait plutôt dû au fait que la photorespiration: (i) évite une sur-réduction de la chaîne de transport d'électrons en présence d'une faible concentration de CO₂ et, (ii) conserve un rapport NADP/NADPH favorisant le transport cyclique d'électrons autour du PS I (Wu *et al.*, 1991). Nous avons déjà vu les implications positives du transport cyclique d'électrons vis-à-vis de la protection contre la photoinhibition.

Au niveau de la cellule ou de la plante entière, les modifications visant à augmenter la tolérance aux stress de hautes intensités lumineuses se déroulent sur des périodes de temps plus longues que celles découlant des modes biophysiques ou métaboliques. Ultiment, les mécanismes adaptatifs décrits au Tableau I (page 8) se mettent en branle lors de longues expositions.

Outre des changements dynamiques dans l'architecture du feuillage ou dans les propriétés spectrales de la feuille, une réduction de l'absorbance peut survenir suite à un mouvement des chloroplastes à l'intérieur des cellules (Schönbohm, 1987). Ce mouvement mène à une agrégation des chloroplastes d'où un auto-ombrage, ou à une disposi-

tion de ceux-ci telle que la surface exposée devienne minimale (Zurzycki, 1972). On croit que ces mouvements sont régis par le phytochrome (Schönbohm, 1987).

Chez les plantes supérieures, les mouvements foliaires causés par l'irradiation sont étudiés depuis bon nombre d'années. Comme je l'ai écrit dans les premières pages de ce travail, certaines plantes désertiques peuvent orienter préférentiellement leurs feuilles vers le soleil afin de maximiser l'absorption (Ehleringer et Forseth, 1980). Mais, lors de stress photoinhibiteur, seul (Gamon et Pearcy, 1989) ou avec des conditions de stress hydrique (Dubetz, 1969, Ludlow et Björkman, 1983), ces mêmes plantes vont réorienter parallèlement la surface de leurs feuilles à la radiation solaire, réduisant ainsi l'absorption, ce qui permet d'éviter la photoinhibition.

1.3.5 Recouvrement

Une analyse attentive des processus de réparation peut nous renseigner sur les sites d'action de la photoinhibition. La figure 8 présente un schéma résumant les processus de réparation de la protéine Q_B (traduite de Kyle, 1987). La synthèse de nouvelles protéines se révèle nécessaire afin qu'il y ait recouvrement, puisque le chloramphénicol, un inhibiteur de la traduction de l'ARN-m, bloque le processus (Greer *et al.*, 1986). Ces protéines nouvellement formées proviennent de gènes chloroplastiques, non pas de gènes nucléaires (Ohad *et al.*, 1985, Greer *et al.*, 1986, Reisman *et al.*,

1986, Samuelsson *et al.*, 1985, 1987). Cette donnée supporte les déterminations biochimiques montrant que le PS II constitue le site primaire de dommages, puisque toutes les protéines intrinsèques du PS II sont codées au niveau du chloroplaste (Murata et Miyao, 1989).

La seconde étape limitant le processus de réparation constitue l'incorporation de la nouvelle protéine - et l'enlèvement de celle endommagée- dans la membrane thylacoï-

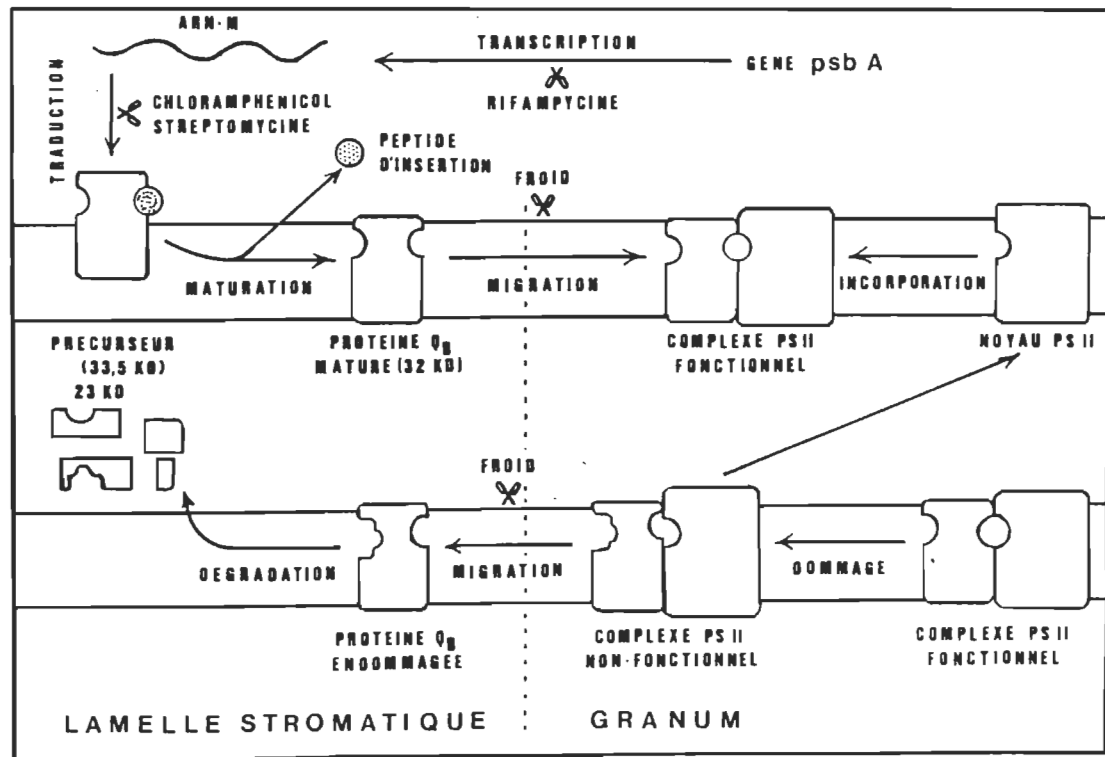


Figure 8: Le cycle de vie de la protéine Q_B .

dienne. Les mesures de marquage radioactif ont montré que seule la cinétique d'enlèvement de la protéine Q_B correspondait, avec un léger décalage, à la cinétique de perte d'activité du PS II (Ohad *et al.*, 1985). Ceci correspondrait au temps mis par la nouvelle protéine à diffuser des lamelles stromatiques vers les thylacoïdes (Wettern, 1986). Le froid pourrait jouer un rôle important en ralentissant les processus de réparation et de migration de la protéine Q_B , ce qui rendrait l'organisme beaucoup plus photosensible aux basses températures (Kyle, 1985, Greer, 1988).

Le concept développé au cours des dernières années veut que la photoinhibition, telle que détectée par la perte de l'activité du PS II, ne se produise que lorsque le taux de création de dommages excède celui des réparations (Kyle et Ohad, 1986, Greer *et al.*, 1986). Ceci pose un certain problème dans le cadre de mesures *in vivo* mais est contourné en travaillant avec des membranes thylacoïdiennes.

1.4 Les objectifs de ce projet de recherche

Dans la nature, certaines plantes sont reconnues comme étant des espèces pionnières, c'est-à-dire les premières espèces végétales à coloniser un écosystème. D'autres espèces sont dites de climax, puisqu'elles constituent les secondes et troisièmes générations de plantes à peupler cet espace géographique (Daubenmire, 1968). Les espèces pionnières doivent être capables de supporter moult conditions adverses; parmi

celles-ci, elles sont exposées à la forte et continuelle irradiation solaire. C'est le cas entre autres du bleuetier, qui est reconnu pour recoloniser (Marie-Victorin, 1964) par exemple les terres laissées en jachère ou les brûlis (Louis Hémon en a fait une remarquable description dans *Maria Chapdelaine* (1949)). A l'opposé, certaines espèces de climax, comme par exemple l'érable à sucre, requièrent un ombrage suffisant afin de se développer (ce qui ne les empêche pas de devenir des arbres dont le feuillage constitue la voûte de la forêt).

Par contre, les jeunes plants poussant à l'ombre doivent expérimenter des conditions de lumière différentes de celles prévalant à la cime. Des variations de la qualité de la lumière incidente surviennent régulièrement, ce qui nécessite une acclimatation rapide des mécanismes photosynthétiques afin de maximiser cette activité photosynthétique.

Ce sont ces phénomènes naturels, cette diversité dans la tolérance aux variations de luminosité, autant en qualité qu'en quantité, qui a éveillé ma curiosité dans un premier temps. Si les bleuetiers sont capables de pousser en pleins champs, ce que les érables réussissent très difficilement, est-ce dû à une résistance supérieure à la photoinhibition? Si oui, quels en sont les mécanismes? A l'intérieur de la même espèce, certaines plantes finissent par se retrouver dans des conditions lumineuses différentes; conservent-

elles les traits de tolérance, ou de sensibilité, de l'espèce? Ces questions ont orienté mon travail au cours de ces dernières années.

Ainsi, l'objectif général de ce travail s'avère de caractériser les effets de la lumière incidente chez les plantes. De façon particulière, je compte étudier les états de transition se produisant chez les plantes supérieures lors de variations qualitatives de la lumière incidente. De plus, les effets d'un stress de hautes intensités lumineuses sur l'activité photosynthétique seront analysés.

Pour ce faire, des plantes reconnues comme résistantes (les bleuetiers) et sensibles (les jeunes érables) à la croissance en plein champs seront analysées. Je veux aussi vérifier l'effet de l'environnement lumineux lors de la croissance sur l'intensité des effets photoinhibiteurs. La détermination des activités des PS I et PS II *in vivo* lors de la photoinhibition sera effectuée. De plus, certains mécanismes de protection (transport cyclique autour du PS I, migration des complexes collecteurs de lumière du PS II, émission de chaleur augmentée) seront étudiés, et leur apport protecteur sera évalué.

La majeure partie des résultats provient de mesures photoacoustiques. Cette méthodologie se révèle d'intérêt pour ce projet, puisqu'elle permet de mesurer l'activité de l'appareil photosynthétique via l'emmagasinement d'énergie photosynthétique et le dégagement d'oxygène, en plus de déterminer le dégagement thermique. Un deuxième

objectif majeur de ce travail est de développer une méthodologie photoacoustique me permettant de caractériser l'activité des deux photosystèmes séparément, méthodologie que j'utiliserai éventuellement en vue de suivre l'effet des variations lumineuses sur l'appareil photosynthétique.

Au cours de nos travaux, nous avons aussi eu à caractériser le signal photoacoustique d'O₂, qui semble erratique sous certaines conditions de mesure. Ceci nous a amené à développer une méthodologie d'infiltration d'eau de la feuille, afin d'éviter ce signal d'O₂, même à basse fréquence de modulation.

CHAPITRE 2

LA SPECTROSCOPIE PHOTOACOUSTIQUE

D'un point de vue sémantique, la spectroscopie photoacoustique permet "d'écouter la lumière", puisqu'elle mesure la transformation de l'énergie lumineuse en pression acoustique, suite à son absorption intermittente par un corps. Nous effectuerons dans cette section un bref survol de la théorie photoacoustique avant d'aborder les applications de cette méthodologie dans l'étude de la photosynthèse. La partie finale vise à expliquer la méthodologie expérimentale que j'utiliserai lors de mon étude des effets de la lumière incidente sur l'activité photosynthétique.

2.1 Historique

Le principe de la spectroscopie photoacoustique a été découvert par Alexander Graham Bell en 1880 alors qu'il poursuivait des recherches sur différents moyens de communication (Bell, 1880). Le photophone, puis le spectrophone de Bell et Tainter intéressèrent rapidement la communauté scientifique de l'époque (Preece, 1881, Rayleigh, 1881, Tyndall, 1881). Dans cet appareil, le soleil servait de source lumineuse et le rotor d'une machine à coudre permettait la rotation d'un disque modulateur. Suite à l'absorption de la lumière par un échantillon fortement absorbant, l'onde acoustique était détectée par l'oreille appuyée contre un cornet acoustique (Bell, 1881). Ce grand intérêt pour cette nouvelle technique s'estompa rapidement, principalement à cause de la faible sensibilité du détecteur, l'oreille.

Au cours du XX^{ième} siècle, la méthodologie photoacoustique demeura confinée à l'étude des propriétés des gaz, à cause de leur efficacité à convertir la chaleur en pression acoustique (Lüscher, 1981). Ce n'est qu'avec l'avènement de puissantes pièces électroniques, et leur miniaturisation, que la détection aisée des ondes acoustiques générées dans les solides a pu être réalisée (Harschbarger et Robin, 1973). La synthèse d'une théorie expliquant l'effet photoacoustique dans les solides (Rosencwaig et Gersho, 1976) a permis l'émergence de la spectroscopie photoacoustique comme outil de valeur pour étudier les propriétés optiques et thermiques de solides opaques.

2.2 Théorie de l'effet photoacoustique dans les solides

Au cours des prochaines lignes, nous aborderons quelques points saillants de la théorie de Rosencwaig et Gersho traitant de l'effet photoacoustique dans les solides. Un traitement plus détaillé de cette théorie peut être retrouvé dans Rosencwaig et Gersho (1976), Adams (1982) et dans mon mémoire de maîtrise (Charland, 1989).

Trois importants processus physiques se révèlent responsables de la genèse du signal photoacoustique: l'absorption de la lumière, sa conversion en chaleur et la diffusion de la chaleur dans l'échantillon. On peut exprimer cette relation par:

$$\frac{\text{Intensité du Signal PA}}{PA} = f \left(\frac{\text{Energie quantique absorbée}}{\text{absorbée}}, \frac{\text{Efficacité de la conversion non-radiative}}{\text{conversion}}, \frac{\text{Efficacité du transfert thermique}}{\text{transfert}} \right) \quad (1)$$

De façon particulière, l'absorption de lumière s'effectue à l'intérieur de la longueur d'absorption optique μ_β , dont la valeur peut être retrouvée par l'équation:

$$\mu_\beta = \frac{1}{\beta} = \frac{1}{2,3 \epsilon C_l} \quad (2)$$

où β est le coefficient d'absorption optique (m^{-1}), lequel est relié, grâce à la loi de Beer-Lambert, à l'absorptivité molaire ($(\epsilon) [\text{M}^{-1} \text{m}^{-1}]$), et à la concentration molaire du chromophore ($(C_l) [\text{M}]$). En fait, la longueur d'absorption optique représente la profondeur à laquelle l'intensité lumineuse vaut $1/e$ de l'intensité lumineuse incidente. Dans un milieu opaque ou semi-transparent, μ_β est inférieur à l'épaisseur de l'échantillon; la saturation optique qui en résulte peut causer de sérieuses distorsions spectrales. Nous verrons un peu plus loin, qu'un des grands avantages de la spectroscopie photoacoustique réside dans la possibilité de choisir des conditions expérimentales nonobstant la saturation optique.

Rosencwaig et Gersho (1976) ont proposé un modèle permettant la description d'un flux thermique unidirectionnel dans un matériau dont les propriétés thermiques sont indépendantes de la position et de la température. Ainsi, l'onde thermique est décrite par:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} - \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = 0 \quad (3)$$

où T représente la température (K); x , la position (m) et t , le temps (s). La diffusivité thermique du matériau (α), [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$] est définie comme étant:

$$\alpha = \frac{k}{\rho \cdot C_i} \quad (4)$$

où les valeurs de la conductivité thermique (k [$\text{J s}^{-1} \text{m}^{-1} \text{K}^{-1}$]), de la masse volumique (ρ [kg m^{-3}]) et de la chaleur spécifique (C_i [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$]) de l'échantillon peuvent être retrouvées dans les tables physiques appropriées (par exemple: Touloukian, 1973).

Les conditions prévalant aux frontières de l'échantillon régissent la solution de l'équation (3). Posons que la température à la surface ($x = 0$) soit une fonction harmonique du temps telle qu'exprimée par:

$$T = T_o \cos(\omega \cdot t) \quad (5)$$

où ω constitue la fréquence angulaire ($\omega = 2\pi f$, [s^{-1}]) de la variation périodique de la température. La solution de l'équation (3) se présente alors sous la forme de :

$$T = T_o \exp\left[-x \sqrt{\frac{\omega}{2\alpha}}\right] \cdot [\cos((\omega.t) - (x \sqrt{\frac{\omega}{2\alpha}}))] - A \quad (6)$$

où A représente une variation transitoire de T causée par l'amorce de l'oscillation au temps $t = 0$. Lorsque la durée du phénomène augmente, A devient négligeable. Selon cette équation, il est possible de relier l'amplitude de l'onde thermique à:

$$\exp\left[-x \sqrt{\frac{\omega}{2\alpha}}\right] \quad (7)$$

Ainsi, une augmentation de x ou de ω conduit à une diminution de l'amplitude de l'onde thermique. Le facteur $\sqrt{\omega/2\alpha}$ est défini comme étant le coefficient de diffusion thermique (a_s , [m^{-1}]). Rosencwaig et Gersho ont décrit, à partir de ce coefficient, un paramètre très important en spectroscopie photoacoustique, la longueur de diffusion thermique (μ_s , [m]).

$$\mu_s = \frac{1}{a_s} = \sqrt{\frac{2\alpha}{\omega}} \quad (8)$$

La longueur de diffusion thermique représente la profondeur à l'intérieur de l'échantillon responsable des ondes thermiques réussissant à diffuser jusqu'à la surface pendant le cycle d'illumination (Boucher *et al.*, 1986). En fait, cette approximation se situe entre celles exprimées par Rosencwaig et Gersho (1976), $2\pi\mu$, et

par Malkin et Cahen (1981), $\mu / \sqrt{2}$. A partir de l'équation (8), on constate que μ_s est inversement proportionnel à la racine carrée de la fréquence angulaire de modulation. Ainsi, il devient possible de déterminer des conditions expérimentales nous permettant de sonder une profondeur connue de l'échantillon. On utilise ce principe dans la méthodologie dite de profil de profondeur (Adams et Kirkbright, 1977) où il devient possible de dresser une carte chromophorique de l'échantillon. Cette approche constitue un des avantages uniques de la spectroscopie PA.

La génération du signal photoacoustique dans un solide peut se résumer de la manière suivante (figure 9). Un échantillon est déposé à l'intérieur d'une enceinte acoustique hermétiquement close. Un faisceau lumineux intermittent est dirigé vers l'échantillon où il est absorbé. Par définition, la longueur d'absorption optique correspond à la profondeur à l'intérieur de l'échantillon où $1/e$ de l'intensité incidente demeure. Lors de l'absorption lumineuse, les molécules de l'échantillon sont excités à des niveaux énergétiques supérieurs. Les transitions non-radiatives constituent un mode de désexcitation des molécules, dégageant ainsi de la chaleur. Les ondes thermiques ainsi produites diffusent à l'intérieur de l'échantillon vers la surface. La longueur de diffusion thermique représente la profondeur à partir de laquelle les ondes thermiques peuvent diffuser jusqu'à la surface pendant un cycle d'illumination. Par la suite, la chaleur originant de l'échantillon réchauffe le gaz de couplage à la surface de celui-ci. La mince couche de gaz ainsi réchauffée, étant contenue à l'intérieur d'une enceinte close, agit comme un piston sur le gaz environnant, augmentant ainsi la pression. Cette variation de pression génère une onde acoustique qui se propage *via* le gaz de couplage jusqu'au détecteur, habituellement un microphone.

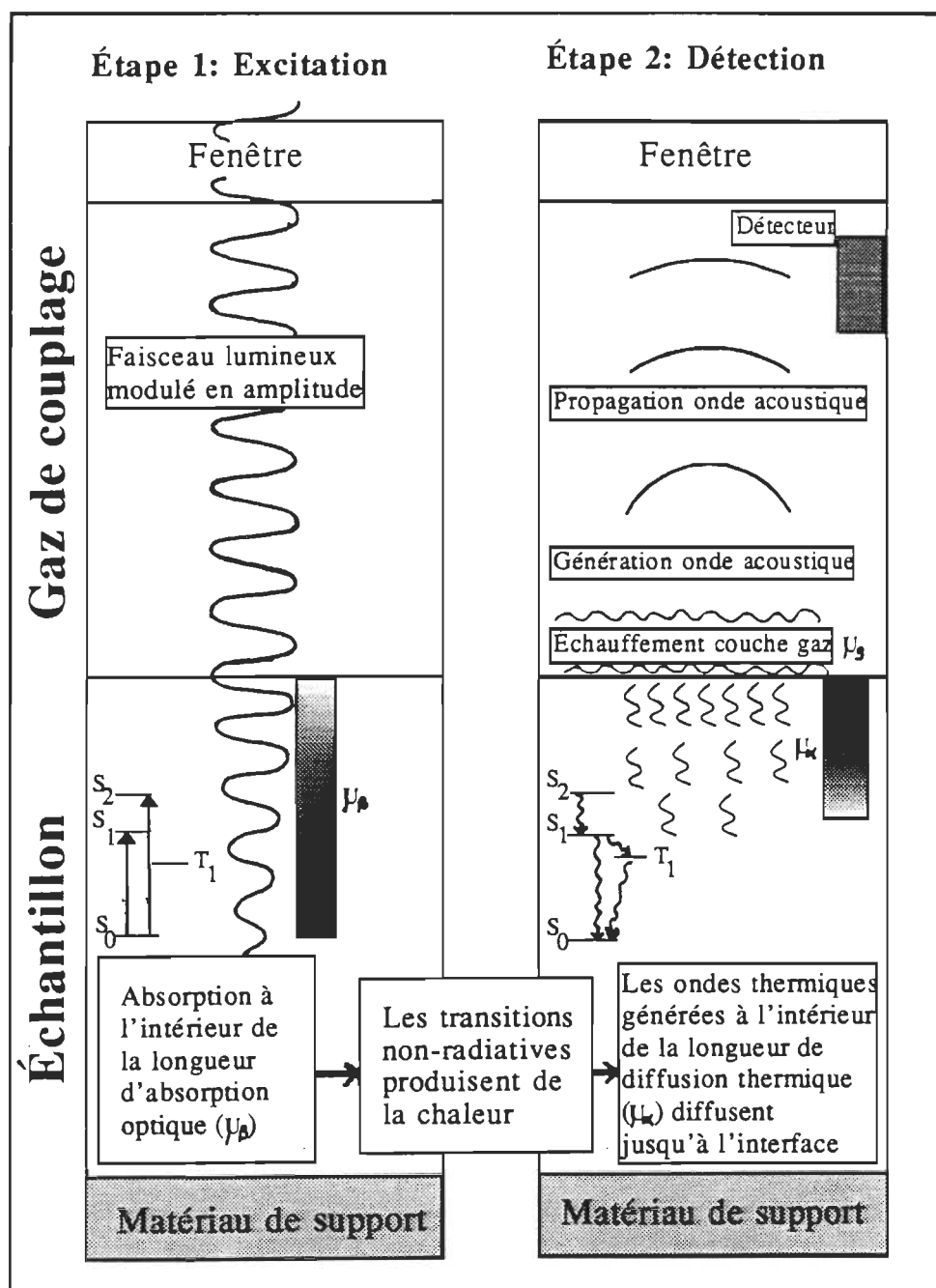


Figure 9: La génération du signal PA dans les solides. S_0 : État fondamental des électrons de la molécule, S_1 : état excité singulet 1, S_2 : état excité singulet 2, T_1 : état excité triplet 1, μ_g longueur de diffusion thermique du gaz de couplage.

2.3 Applications dans l'étude de la photosynthèse

Bien que la spectroscopie photoacoustique ne soit appliquée à des échantillons biologiques que depuis une quinzaine d'années, elle a permis des percées importantes dans ce domaine (pour des revues, voir Balasubramanian et Rao, 1986, Braslavsky, 1986, Buschmann, 1989 et N'soukpoé-Kossi et Leblanc, 1988). Un des avantages de la SPA réside dans le fait que l'on détecte la chaleur dégagée consécutive à l'absorption lumineuse, alors que les méthodes spectroscopiques usuelles sont basées sur la détection de la lumière transmise ou réfléchiée par l'échantillon. Ainsi, on évite en SPA les aléas d'échantillons opaques ou hautement diffusants, problèmes courants avec les échantillons biologiques (Braslavsky, 1986).

Deux grandes approches ont été privilégiées dans l'application de la SPA au domaine de la photosynthèse: (i) L'approche spectroscopique permet de détecter et de localiser les différents pigments présents dans l'organisme photosynthétique. Cette approche peut aussi aider à mieux comprendre les transferts d'énergie entre les divers pigments. (ii) L'approche physiologique rend possible la détermination de l'activité photosynthétique de l'échantillon *via* l'emmagasinement d'énergie photosynthétique et le dégagement d'O₂.

2.3.1 Aspect spectroscopique

Dans un premier temps, les aspects spectroscopiques des pigments photosynthétiques ont été étudiés dans des systèmes modèles tels les monocouches et les

multicouches (Désormeaux et Leblanc, 1985), dans l'acétone (Upadhyaya *et al.*, 1985) ou dans des films d'alcool de polyvinyle (Frackowiak *et al.*, 1985 a et b) ou de polymères (Moore *et al.*, 1983). Par la suite, les travaux ont été étendus à la détermination de l'effet de l'orientation de thylacoïdes et de chloroplastes dans ce dernier milieu (Frackowiak *et al.*, 1985 c).

Comme il est possible de travailler avec des organismes *in vivo*, l'analyse pigmentaire du phytoplancton (Ortner et Rosencwaig, 1977), de halobactéries (Cahen *et al.*, 1978) et de stromatolites (Schubert *et al.*, 1980) ou de cyanobactéries (Carpentier *et al.*, 1983 a et b) a pu rapidement être réalisée. L'effet de déficiences en caroténoïdes sur le transfert d'énergie chez *Rhodospirillum* a également été évalué (Boucher *et al.*, 1983). Des mesures spectroscopiques ont aussi été effectuées avec des chloroplastes (Dienstbier *et al.*, 1984), des thylacoïdes (Thomasset *et al.*, 1982, 1983), voire des particules de thylacoïdes enrichies en PS I (Vacek *et al.*, 1979) ou en PS II (Camm *et al.*, 1988).

Les travaux sur des feuilles entières² ont permis de constater la variation pigmentaire entre les deux faces d'une feuille (Veeranjaneyulu et Das, 1983) lors du verdissement (Buschmann et Prehn, 1981) ainsi que pendant la différenciation d'un cal³ (Farringer *et al.*, 1985). La présence d'anthocyanes lors d'un stress hydrique a également été détectée (Veeranjaneyulu et Das, 1982), tout comme les

² Il serait plus juste de parler d'une partie de feuille puisque seule une section est placée dans la cellule photoacoustique. Néanmoins, j'utiliserai le terme de feuille entière, maintenant usuel, pendant ce travail.

³ Cal: Ensemble de cellules non-différenciées obtenu lors de la culture de tissus végétaux.

variations spectrales induites chez des mutants déficients en chlorophylles ou en caroténoïdes (Lima *et al.*, 1985). La SPA a servi comme indicateur précoce de dommages pigmentaires lors de stress environnemental comme la pollution (Nagel *et al.*, 1987) ou causé par l'ajout d'herbicides (Szigeti *et al.*, 1989).

Un autre aspect fort intéressant de l'approche spectroscopique réside dans l'analyse du profil de profondeur. Ainsi, des cartes chromophoriques de feuilles (Buschmann et Prehn, 1983, Charlebois, 1992) présentent la variation de la distribution pigmentaire dans le spécimen. Il devient aussi possible, en utilisant la méthodologie de séparation de phase, de localiser l'algue vivant en symbiose avec le champignon à l'intérieur d'un lichen (O'Hara *et al.*, 1983).

2.3.2 Aspect physiologique

La chlorophylle constitue certes la molécule-clé en photosynthèse, puisqu'elle est responsable de l'absorption de l'énergie quantique et de son éventuelle transformation en énergie chimique. La représentation des différents modes d'excitation et de désexcitation de cette molécule *in vivo*, schématisée à la figure 10, nous permet de mieux apprécier l'utilisation de la méthodologie photoacoustique en physiologie végétale.

Suite à l'absorption lumineuse, quatre grandes voies de désexcitation s'offrent à la chlorophylle (figure 10): (i) Les désexcitations non-radiatives induisent une émission de chaleur. Nous nous servons justement de ce phénomène en SPA; (ii) L'émission de fluorescence (où le quantum émis est de moindre énergie que

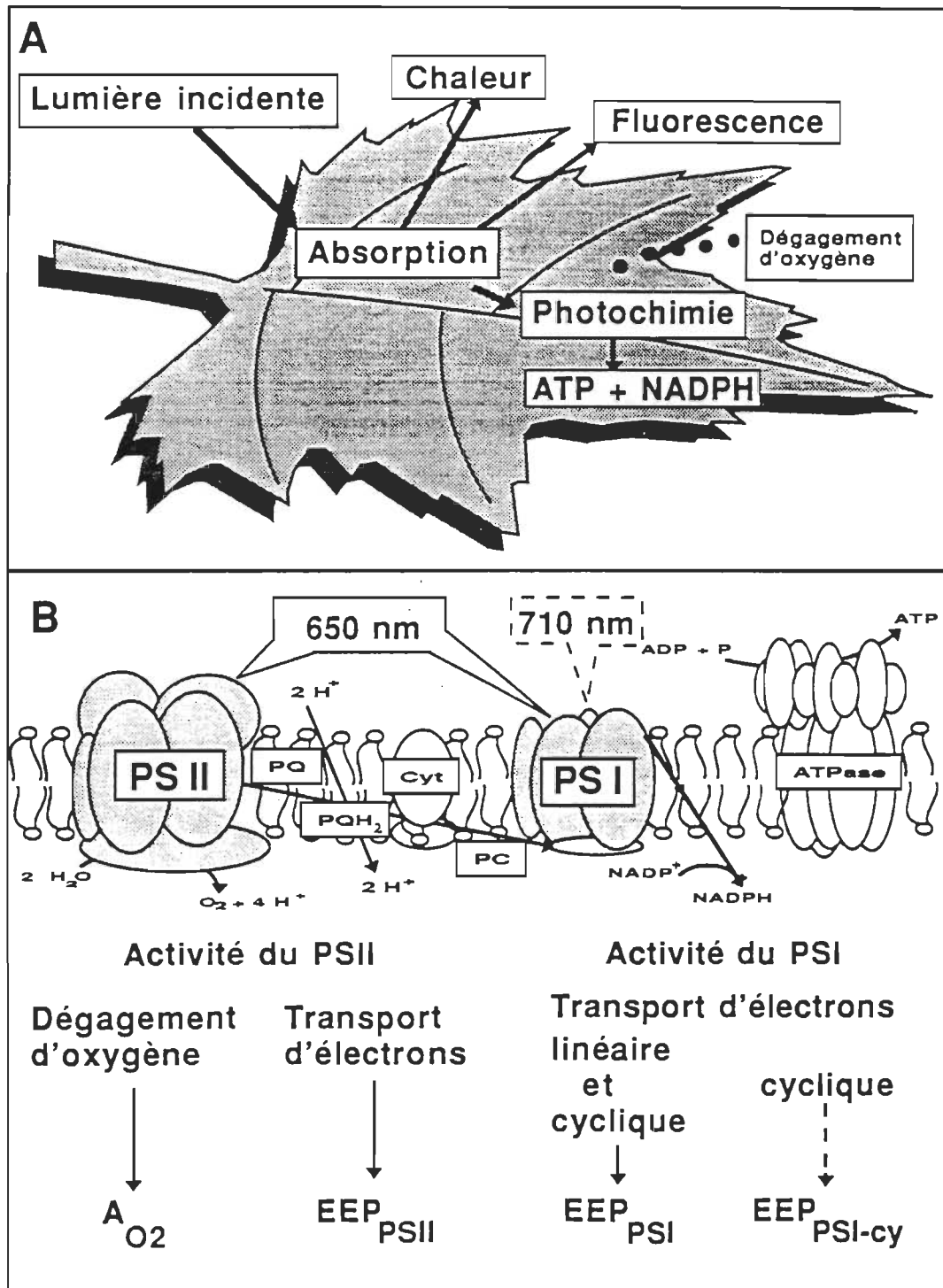


Figure 10: A- Modes de désexcitation de la chlorophylle *a* *in vivo*. B- Représentation schématique des mesures photoacoustiques de l'activité photosynthétique d'une feuille.

celui absorbé) s'avère aussi abondamment utilisée comme indicateur de l'activité photosynthétique (Krause et Weis, 1991). Comme elle ne représente que de 3 à 5 % du total des modes de désexcitation (Barber *et al.*, 1989), elle est considérée dans les mesures photoacoustiques comme négligeable (Bults *et al.*, 1982); (iii) Le transfert d'énergie se déroule principalement entre les molécules des complexes collecteurs de lumière lors de la migration de l'exciton vers les centres réactionnels des PS I ou PS II. Ultimement, l'énergie est dissipée selon une des trois autres voies de désexcitation; et (iv) L'activité photochimique à l'intérieur des centres réactionnels des PS I et PS II mène ultimement au dégagement d'O₂, à l'établissement d'un gradient électrochimique de protons directement responsable de la synthèse d'ATP, et à la formation de NADPH.

Les échanges énergétiques se produisant au sein de la feuille peuvent être résumés selon l'équation:

$$E_{\text{absorbée}} = E_{\text{chaleur}} + E_{\text{luminescence}} + E_{\text{photochimie}} \quad (9)$$

où E représente l'énergie, sous ses différentes formes. Dans une feuille, la grande partie de la luminescence provient de la fluorescence, qui comme nous l'avons déjà écrit, est considérée comme négligeable dans l'analyse du signal PA (Bults *et al.*, 1982). Dès lors, la relation exprimant l'énergie absorbée, transformée en chaleur devient:

$$E_{\text{chaleur}} = E_{\text{absorbée}} - E_{\text{photochimie}} \quad (10)$$

Le taux de production de chaleur (H) est alors donné par:

$$H = [(N.h.\nu) - \sum (\phi_i \cdot \Delta E_{pi})].I \quad (11)$$

et le signal PA en présence d'un faible faisceau modulé (Q_m) s'exprime par:

$$Q_m = a.[(N.h.\nu) - \sum (\phi_i \Delta E_{pi})].I \quad (12)$$

où N est le nombre d'Avogadro, h représente la constante de Planck, ν est la fréquence de la lumière incidente, ϕ_i est le rendement quantique de la réaction photochimique i, ΔE_{pi} est la différence d'énergie par mole de produit formé pour la réaction photochimique i, et I est l'intensité de lumière absorbée en Einstein par unité de volume par unité de temps. La constante de proportionnalité a est une reliée à la fois aux propriétés thermiques de l'échantillon et à l'efficacité de la réponse de l'appareil (Malkin *et al.*, 1991).

Nous pouvons déterminer la valeur de $\sum (\phi_i \Delta E_{pi})$ en utilisant l'effet produit par l'addition d'un faisceau continu, capable de saturer la photosynthèse (Bults *et al.*, 1982). Dans ces conditions, l'activité photosynthétique modulée devient nulle, et toute la lumière absorbée est transformée en chaleur. Le signal PA en présence du faisceau modulé et du faisceau saturant (Q_{ms}) peut être exprimé par:

$$Q_{ms} = a(N.h.v).I \quad (13)$$

Ainsi, l'emmagasinement d'énergie photosynthétique (EEP), qui représente la fraction de l'énergie absorbée, emmagasinée dans les divers intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons, est évalué par:

$$EEP = \frac{\sum (\phi_i \Delta E_{pi})}{N.h.v} = \frac{(Q_{ms} - Q_m)}{Q_{ms}} . 100 \quad (14)$$

La méthodologie photoacoustique, telle qu'appliquée en physiologie végétale, mesure le dégagement thermique relié aux désexcitations non-radiatives, et l'activité photosynthétique. Deux paramètres sont utilisés pour quantifier l'activité photosynthétique; soient le dégagement d'oxygène et l'emmagasinement d'énergie photosynthétique (EEP).

Le principe sous-tendant la mesure de l'EEP (nommé au départ "photochemical loss") était dérivé directement de la théorie PA pour des échantillons photochimiquement actifs (Malkin et Cahen, 1979). Les premières mesures ont été effectuées sur des membranes pourpres de halobactéries (Cahen *et al.*, 1978 a), puis étendues à des chloroplastes (Cahen *et al.*, 1978 b). L'emploi de différents modulateurs de l'activité photosynthétique a par la suite permis de mieux caractériser l'EEP lors de mesures PA de chloroplastes (Lasser-Ross *et al.*, 1980) ou de cyanobactéries (Carpentier *et al.*, 1984). Les mesures d'EEP, lorsqu'effectuées à

700 nm, peuvent également servir à déterminer l'activité du transport cyclique autour du PS I (Canaani *et al.*, 1989, Herbert *et al.*, 1990).

Plusieurs travaux ont été entrepris afin de mieux définir la signification de l'EEP en termes moléculaires. C'est pourquoi des fractions membranaires de PS II (Carpentier *et al.*, 1985, Fragata *et al.*, 1987) d'hétérocystes de la cyanobactérie *Anabaena* -pour le PS I- (Carpentier *et al.*, 1986) ont été étudiées. Chez les chloroplastes de cellules périfasciculaires du maïs, l'activité du PS I n'est que partiellement régularisée par le PS II, des composés endogènes pouvant induire une activité photochimique du PS I (Popovic *et al.*, 1987). Les travaux de Carpentier et de ses collaborateurs sur des fractions thylacoïdiennes entières, de PS I et de PS II ont permis de présenter un modèle de l'EEP qui s'apparentait à une activité enzymatique (Carpentier *et al.*, 1988, 1989, 1990, Owens *et al.*, 1990).

Dans les feuilles entières, une autre contribution liée à l'activité photosynthétique vient s'ajouter à la contribution thermique et à la composante d'EEP; c'est le dégagement d'O₂ (Bults *et al.*, 1982). Cette contribution avait déjà été détectée par Inoue *et al.* (1979) mais mal interprétée. Poulet *et al.* (1983) ont ensuite élaboré une théorie du signal PA dans les feuilles; théorie basée sur la différence de phase existant entre les contributions photothermique et photobarique, ce qui permet l'évaluation de ces contributions et, de ce fait, la détermination de l'activité photosynthétique. Malkin (1987) a montré que le signal d'O₂ possédait une composante liée à la consommation photochimique d'O₂ lors de l'induction photosynthétique.

La méthodologie PA a par la suite été utilisée pour suivre et/ou pour quantifier l'effet de différents phénomènes sur l'appareil photosynthétique. Le verdissement de plants de pois a pu être suivi via le signal d'O₂ et l'EEP (Canaani *et al.*, 1982). Chez un mutant de type *aurea* de tabac, le rapport caroténoïdes/chlorophylles s'avère supérieur à celui observé chez le type sauvage, mais il possède une efficacité de transfert de l'énergie absorbée par les caroténoïdes vers les centres réactionnels inférieure; ceci a amené Canaani *et al.* (1985) à conclure que les caroténoïdes en excès avaient surtout un rôle à jouer dans la protection de l'appareil photosynthétique contre des intensités lumineuses élevées. La présence d'activité photosynthétique a été détectée dans un lichen (O'Hara *et al.*, 1983, Canaani *et al.*, 1984), ce qui a permis de vérifier l'effet de la pollution (SO₂) sur des lichens soumis à différentes atmosphères *in situ* (Ronen *et al.*, 1985).

Lors d'un stress de basses températures, la baisse de l'activité photosynthétique due à une inhibition du PS II, telle que révélée par le dégagement d'O₂, est corrélée aux mesures enregistrées en fluorescence ou par échanges de CO₂ (Yakir *et al.*, 1985, 1986). La mesure du signal d'O₂ a été utilisée comme indicateur de tolérance aux hautes températures (Havaux *et al.*, 1987 a). Les effets d'un stress hydrique, lent ou rapide, sur le PS II ont aussi été suivis par la méthodologie PA (Havaux *et al.*, 1986 a et b, 1987 b). La résistance à l'herbicide atrazine serait due à plusieurs facteurs, non seulement à une variation de la protéine Q_B (Havaux, 1989). La grande efficacité de plants d'*Epilobium* à croître sous des couverts forestiers a été expliqué grâce aux mesures de dégagement d'O₂ (Havaux, 1990 a). Les effets de polluants atmosphériques (SO₂, O₃) sur l'activité photosynthétique des plantes supérieures ont également été suivis (Veeranjaneyulu *et al.*, 1990,

1991, Charlebois, 1992, Dziri, 1992). Finalement, la méthodologie PA a permis de déterminer la perte d'efficacité du transfert d'énergie entre les pigments lors de la sénescence des plantes (Gruszecki *et al.*, 1991).

En ce qui a trait aux études de l'effet des hautes intensités lumineuses sur l'appareil photosynthétique, quelques travaux ont été effectués. Dans tous les cas relatés ci-bas, l'activité photosynthétique, mesurée *via* l'EEP ou l'amplitude du signal d'O₂, s'est révélée diminuée suite au stress de hautes intensités lumineuses. Toutefois, il a été observé que les membranes thylacoïdiennes présentent une plus grande résistance à la photoinhibition et à la photodégradation ultérieure si elles sont maintenues à l'intérieur d'une matrice de glutéraldéhyde (Carpentier *et al.*, 1987).

Dans le cas de feuilles entières, les intensités lumineuses requises pour induire un effet photoinhibiteur sont supérieures à celles observées pour les membranes thylacoïdiennes. Comme nous l'avons déjà vu plus haut, la photoinhibition mène à une diminution du rendement quantique de fluorescence et de l'activité photosynthétique, ce qui, croit-on, pourrait résulter en une augmentation des désexcitations non-radiatives (Critchley et Smillie, 1981). Buschmann et Prehn (Buschmann, 1987, Buschmann et Prehn, 1988) et Havaux (1989) ont montré que, suite à un traitement photoinhibiteur, l'activité photosynthétique (induction des signaux PA pour Buschmann, 1987; signal d'O₂ et EEP pour Havaux, 1989) et la fluorescence se retrouvaient diminuées, alors que le signal photothermique augmentait. Par la suite, cette élévation du signal A_{PT} n'a pu être corrélée avec une augmentation du rapport violaxanthine/zéaxanthine du cycle des xanthophylles

(Havaux *et al.*, 1991), ce qui infirme en partie le modèle de Demmig et de ses collaborateurs (Demmig *et al.*, 1987). Chez *Chlamydomonas*, une augmentation de l'activité du transport cyclique d'électrons autour du PS I a aussi été notée, ce qui a été interprétée comme un autre moyen de protection (Canaani *et al.*, 1989). Les travaux de Greenberg et de ses collaborateurs ont montré la présence de différents médiateurs de la dégradation de la protéine Q_B en lumière ultraviolette ou visible (Greenberg *et al.*, 1989). L'importance du système SOD comme protecteur de l'appareil photosynthétique face à de hautes intensités lumineuses a également été démontrée chez des plants résistants au Paraquat (Jansen *et al.*, 1989).⁴

D'un point de vue plus fondamental, les travaux de Canaani et Malkin sur les états de transition ont permis d'expliquer *in vivo* le phénomène moléculaire à l'origine de cette redistribution d'énergie entre les deux photosystèmes (Canaani *et al.*, 1982, 1984 a, Canaani et Malkin, 1984 a et b, Canaani, 1986, Malkin *et al.*, 1986 a et c, Dau et Canaani, 1990). La distribution de l'énergie absorbée entre les deux photosystèmes a également été estimée chez des plants de blé (Malkin *et al.*, 1986 b et c), chez des algues rouges (Malkin *et al.*, 1990) et brunes (Fork *et al.*, 1991) et des mutants de tabac (Canaani, 1990).

Les mesures de cinétique d'induction de la photosynthèse sont très utilisées en physiologie végétale afin de caractériser le potentiel de l'appareil photosynthétique. Il a été démontré que la cinétique d'EEP était similaire à celle observée pour

⁴ Le Paraquat est un herbicide qui agit en acceptant des électrons du PS I, formant ainsi des radicaux superoxyde, et autres espèces d' O_2 toxiques. On a montré chez certaines plantes résistantes un taux très élevé d'activité du système SOD ce qui, croit-on, détoxifierait les cellules de ces composés toxiques.

l'atténuation de fluorescence (ou si l'on préfère, le signal thermique suivait parallèlement le signal de fluorescence), ce qui dénote une origine commune de ces deux signaux (Kato et Yamagishi, 1984). Buschmann (1987) a montré qu'un traitement photoinhibiteur diminuait l'amplitude de cette cinétique thermique, de la même façon que celle de fluorescence, mais avait pour effet d'augmenter le signal photothermique. De façon plus générale, les divers mécanismes d'atténuation de la fluorescence ont été mis en relation avec la cinétique thermique (Buschmann et Kocsányi, 1989, Havaux, 1990 b, Snel *et al.*, 1990 a).

La cinétique d'induction d'O₂ se révèle plus complexe à interpréter, puisqu'une composante liée à la consommation photochimique d'O₂ se trouve détectée (Malkin, 1987), particulièrement après un choc thermique (Havaux *et al.*, 1987 c). Néanmoins, cette cinétique d'induction d'O₂ peut être reliée à celle prévalant en fluorescence (Havaux, 1988), et aux mécanismes d'atténuation de fluorescence (Snel *et al.*, 1990 b, Dau et Hansen, 1990). Ainsi, la cinétique d'induction d'O₂ peut servir à établir les mécanismes d'adaptation de l'appareil photosynthétique à des changements rapides de la qualité et de l'intensité lumineuse (Dau et Hansen, 1989).

L'utilisation d'une source laser pulsée, en réduisant le domaine de temps étudié, a permis de sonder des intermédiaires plus rapprochés de l'acte photochimique dans la feuille (Jabben et Schaffner, 1985) ou dans des particules thylacoïdiennes (Nitsch *et al.*, 1988). De plus, les intermédiaires S₀ - S₄ du cycle photochimique menant au dégagement d'O₂ ont pu être suivis dans une feuille (Canaani *et al.*, 1988), ce qui constitue un avantage indéniable puisque la technique polarographi-

que usuelle ne peut utiliser que des couches minces de chloroplastes ou d'algues. Ce type de méthodologie permet également de mesurer simultanément la consommation d'O₂ (Kolbowski *et al.*, 1990, Mauzerall, 1990) et probablement de CO₂ (Kolbowski *et al.*, 1990). Les travaux amorçés avec la méthodologie PA pulsée sont de premier intérêt, à cause de leur potentiel à quantifier un lot fort impressionnant de phénomènes photosynthétiques.

D'un point de vue technique, la mise au point d'une cellule photoacoustique équipée d'une fenêtre perméable aux gaz devrait permettre une évaluation de l'activité photosynthétique encore plus juste, puisque les concentrations de CO₂ présent dans la cellule photoacoustique s'avèrent près de la réalité (Fork et Herbert, 1991). Ceci évite de travailler sous des conditions près du point de compensation, et permet de travailler sous des atmosphères variées.

2.3.3 Détermination expérimentale de A_{O_2} et EEP

Nous avons vu auparavant que le signal photoacoustique d'une feuille était composé de deux contributions originant des chloroplastes, soient (i) la contribution photothermique et (ii) la composante photobarique due aux échanges d'O₂.

D'un point de vue scalaire, le signal photoacoustique d'une feuille peut être exprimé selon la relation suivante:

$$A = A_{PT} - EEP + A_{O_2} \quad (15)$$

où A représente l'amplitude du signal photoacoustique, A_{PT} est l'amplitude de la composante photothermique maximale et A_{O_2} constitue l'amplitude du signal dû aux échanges d' O_2 . La figure 11 montre la représentation scalaire du signal PA à basse et haute fréquence de modulation.

La méthodologie PA consiste à mesurer la variation du signal photoacoustique induite par la saturation de la photosynthèse chez un spécimen actif. Ainsi, l'application d'un faisceau lumineux continu de forte intensité sature la photosynthèse, enlevant la partie modulée de l'activité photochimique. Dans ces

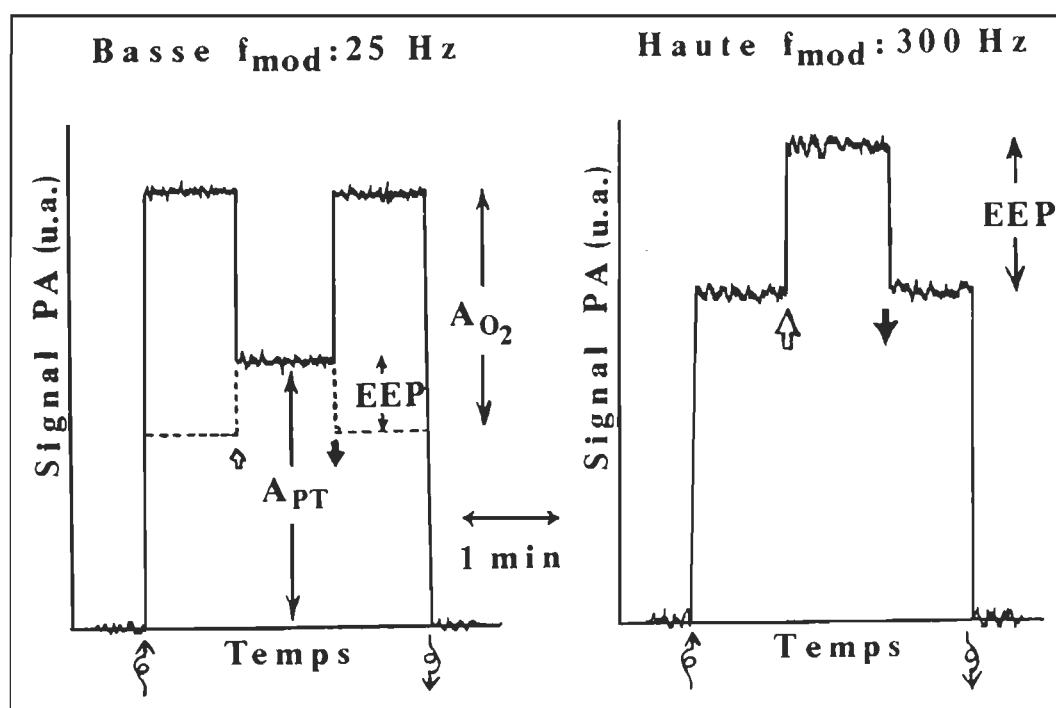


Figure 11: Le signal PA dans les feuilles, aspect scalaire. A-Le signal PA à basse fréquence de modulation. B-le signal PA à haute fréquence de modulation. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction du faisceau modulé, respectivement. Les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction du faisceau saturant blanc, respectivement.

conditions, les composantes d'EEP et de A_{O_2} sont réduites à zéro, puisque le faisceau continu les rend non-modulées, donc non détectables par le système PA. Ainsi, le signal PA obtenu en présence du faisceau saturant est uniquement dû aux désexcitations non-radiatives se produisant dans la feuille (figure 11).

Comme le taux de diffusion de la chaleur dans l'eau diffère beaucoup de celui de l' O_2 ($10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ par rapport à $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivement), il est possible d'utiliser cette donnée afin d'isoler expérimentalement la contribution thermique. A des fréquences de modulation élevées⁵, seule la contribution thermique est détectée, l' O_2 n'ayant pas le temps de diffuser jusqu'à la surface (ou aux espaces aérifères, selon le point de vue) afin de générer une onde acoustique. Dans ces conditions, l'application du faisceau saturant rend possible la détermination de la composante d'EEP (figure 11). Il devient possible d'utiliser cette valeur de EEP dans la détermination des proportions des différentes contributions du signal PA à basse fréquence de modulation.

A première vue, l'addition des deux contributions du signal PA de feuilles peut sembler scalaire. Poulet *et al.* (1983) ont développé un modèle du signal PA où les deux contributions sont représentées par des vecteurs originant du même endroit: le chloroplaste. Comme la chaleur et l' O_2 ne diffusent pas à la même vitesse dans la feuille, les vecteurs de chacune de ces deux contributions présentent des angles de phase différents. La méthode présentée par Poulet permet de séparer ces deux contributions.

⁵ Généralement au-delà de 250 Hz (Bults *et al.*, 1982), mais avec l'érable à sucre, une fréquence de modulation de 80 Hz peut s'avérer suffisante (Charland, 1989).

Le signal photoacoustique résultant (**R**) à basse fréquence de modulation représente la somme vectorielle des contributions thermique (**T**) et d'échanges d'O₂ (**O**) (figure 12-A⁶). Il est possible de mesurer les composantes en phase et en quadrature de ces différents vecteurs en employant un amplificateur à verrouillage de phase (figure 12-B). Lorsque le faisceau saturant est appliqué, les contributions reliées à l'EEP et à l'O₂ disparaissent, pour ne laisser que la contribution thermique maximale (**T**^{*}) (figure 12-C). Il devient alors possible de sélectionner un angle de phase où le vecteur **T**^{*} est amené le long de l'axe en quadrature (figure 12-D). Connaissant la valeur de l'EEP, telle que déterminée à haute fréquence de modulation, l'amplitude du vecteur thermique (**T**) peut être évaluée⁷.

Incidentement, Bults *et al.* (1982 b) et Havaux *et al.* (1990) ont montré par des méthodes photothermiques que l'EEP est similaire à basse fréquence de modulation. En éteignant le faisceau saturant, les contributions liées à l'EEP et au vecteur d'O₂ redeviennent présentes (figure 12-E). Il est à remarquer que la composante en phase du vecteur **R** n'est formée que de la composante en phase du vecteur **O** (figure 12-F); nous utiliserons cette notion afin de suivre le signal d'O₂ au cours de certaines études photoacoustiques (chapitre 4).

Ainsi, l'amplitude du signal d'O₂ est obtenue selon l'équation:

⁶ Il faut bien noter que l'exemple présenté ici n'est placé dans le premier quadrant que pour simplifier l'explication. Dans la réalité, le vecteur **R** peut se situer dans un ou l'autre des quatre quadrants, la situation variant selon la fréquence de modulation employée.

⁷ On assume ici que le vecteur thermique ne change pas d'orientation en présence du faisceau saturant. Nous verrons dans la section résultats que cette prémisse est vraie.

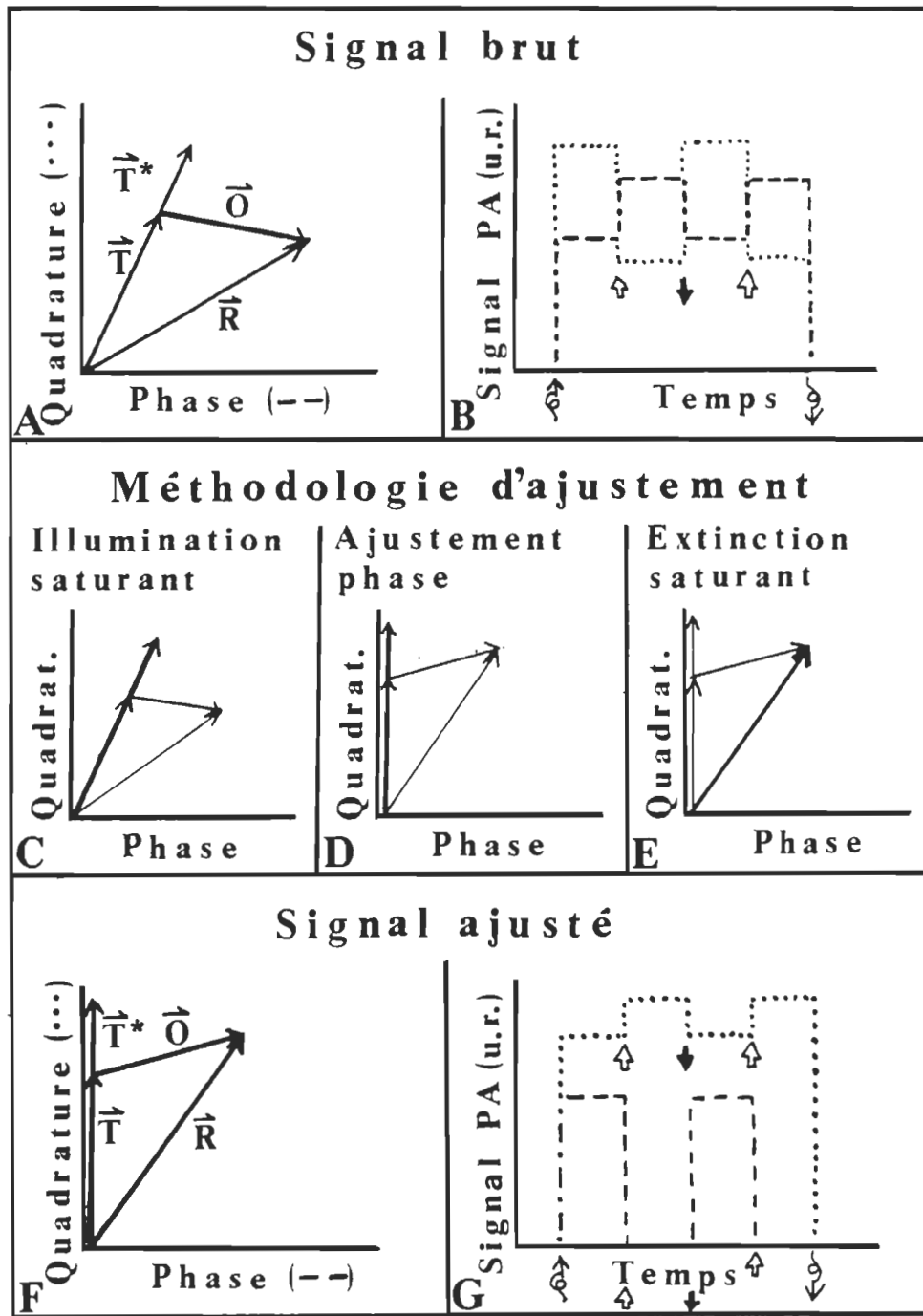


Figure 12: Aspect vectoriel du signal PA dans les feuilles. A et B-Signal PA brut en phase et en quadrature d'une feuille. C à E: Représentation vectorielle du signal PA dans le temps pendant les ajustements de phase, selon la méthodologie de Poulet *et al.*, 1983. F et G- Signal PA ajusté. Les symboles sont similaires à ceux de la figure 11.

$$A_{O_2} = \sqrt{(Q_{m(0^\circ)})^2 + (Q_{m(90^\circ)} - [1 - (\frac{EEP}{100})] \cdot Q_{ms(90^\circ)})^2} \quad (16)$$

Dans les faits, les données brutes requises afin de déterminer l'amplitude de chacune des contributions au signal photoacoustique s'avèrent les composantes du signal PA en présence des faisceaux modulé et actinique $Q_{ms(90^\circ)}$ (en quadrature) et celles obtenues en présence du faisceau modulé $Q_{m(90^\circ)}$ (en quadrature) et $Q_{m(0^\circ)}$ (en phase) que l'on obtient lors des mesures PA à basse fréquence de modulation. La valeur de l'EEP est déterminée à haute fréquence de modulation, selon l'équation 14.

Soit dit en passant, il ne s'avère pas toujours nécessaire d'annuler une composante du signal thermique maximal afin de calculer tous les paramètres photoacoustiques. Il demeure possible d'effectuer toutes ces déterminations sur le signal photoacoustique brut (figures 12A et B), en connaissant toujours la valeur de l'EEP et en utilisant une équation légèrement plus élaborée. L'avantage de la méthodologie décrite ci-haut réside en fait dans la possibilité de suivre une composante du signal d'O₂ dans un seul canal de l'amplificateur de phase.

En vue de normaliser efficacement le signal d'O₂, celui-ci est divisé par le signal photothermique maximal à basse fréquence de modulation $Q_{ms(90^\circ)}$. Cette normalisation permet d'exprimer le signal PA d'O₂ en fonction d'un rendement quantique, puisqu'il est divisé par une valeur, A_{PT} , liée à la quantité d'énergie quantique absorbée.

Ainsi, deux paramètres sont utilisés en SPA en vue de quantifier l'activité photosynthétique: l'amplitude du signal d'O₂ normalisée, A_{O_2}/A_{PT} , déterminée à basse fréquence de modulation et l'emmagasinage d'énergie photosynthétique, EEP, mesuré à haute fréquence de modulation. Nous avons utilisé ces deux paramètres dans notre étude des effets de la variation des conditions lumineuses sur l'activité photosynthétique chez les plantes supérieures.

CHAPITRE 3

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Produits utilisés

Le dichlorophényl diméthyl urée (DCMU, Sigma, Montréal, Québec) est reconnu pour inhiber l'activité photosynthétique (Trebst, 1980). Une solution de 50 μM est employée dans les différentes manipulations visant à caractériser l'activité photosynthétique.

Les mesures portant sur les états de transition requièrent des solutions 0,125 M de NaF (Fischer Scientific, FairLawn, NJ) ou NaCl (Fischer Scientific, FairLawn, NJ) dans un tampon phosphate (Fischer Scientific, FairLawn, NJ) 0,2 M à pH 7.

Lors des extractions pigmentaires, nous avons préparé une solution 80:20 d'acétone (Fischer Scientific, FairLawn, NJ) et d'eau distillée et déminéralisée dans nos laboratoires.

3.2 Le spectromètre photoacoustique

Comme nous l'avons déjà indiqué dans l'introduction, le principe de la méthodologie photoacoustique réside dans la détection d'une onde acoustique, consécutive à l'émission périodique de chaleur de la part d'un échantillon placé dans une enceinte isolée. Nous décrirons au cours des prochaines lignes le spectromètre photoacoustique employé tout au long de ce travail, puis son application dans le cadre de cette étude.

3.2.1 Description de l'appareil

Le spectromètre photoacoustique à simple faisceau dont nous nous sommes servis est schématisé à la figure 13. Une description plus détaillée des différentes composantes est présentée dans le mémoire de Ducharme (1979).

Le faisceau lumineux produit par une lampe au xénon de 1 000 W (modèle 976C1010 de Canrad-Hanovia, Newark, NJ) devient monochromatique suite à son passage à l'intérieur d'un monochromateur à réseau (modèle GMA-251-2 de Schoeffel Instruments Corporation, Westwood, NJ). Deux fentes ajustables, sises de part et d'autre du monochromateur, assurent le contrôle de l'intensité et de la qualité du faisceau d'analyse. La dispersion linéaire du monochromateur est de $3,3 \text{ nm mm}^{-1}$.

Par la suite, le faisceau monochromatique est modulé lors de son passage à travers un disque métallique rotatif. Le disque possède des secteurs évidés alternant avec des secteurs pleins, tous d'égales dimensions. Ainsi, l'intensité lumineuse du faisceau d'analyse suit une courbe quasi-sinusoïdale dans le temps. La rotation du disque est assurée par un moteur relié à un régulateur de fréquences (modèle 218F de Benthams, Ithaca, NY). Des disques dotés de 2, 5 ou 10 fentes permettent d'obtenir une plage de fréquences comprises entre 10 et 1 000 Hz. Une photodiode est fixée au modulateur afin de générer une onde de référence pour l'amplificateur à verrouillage de phase.

Le faisceau d'analyse est par la suite focalisé par une lentille convergente ($f = 35 \text{ cm}$), puis traverse un filtre passe-haut (modèle GG455 de Schott, Watford, UK) qui élimine, au besoin, les harmoniques des longueurs d'onde. Finalement, un miroir

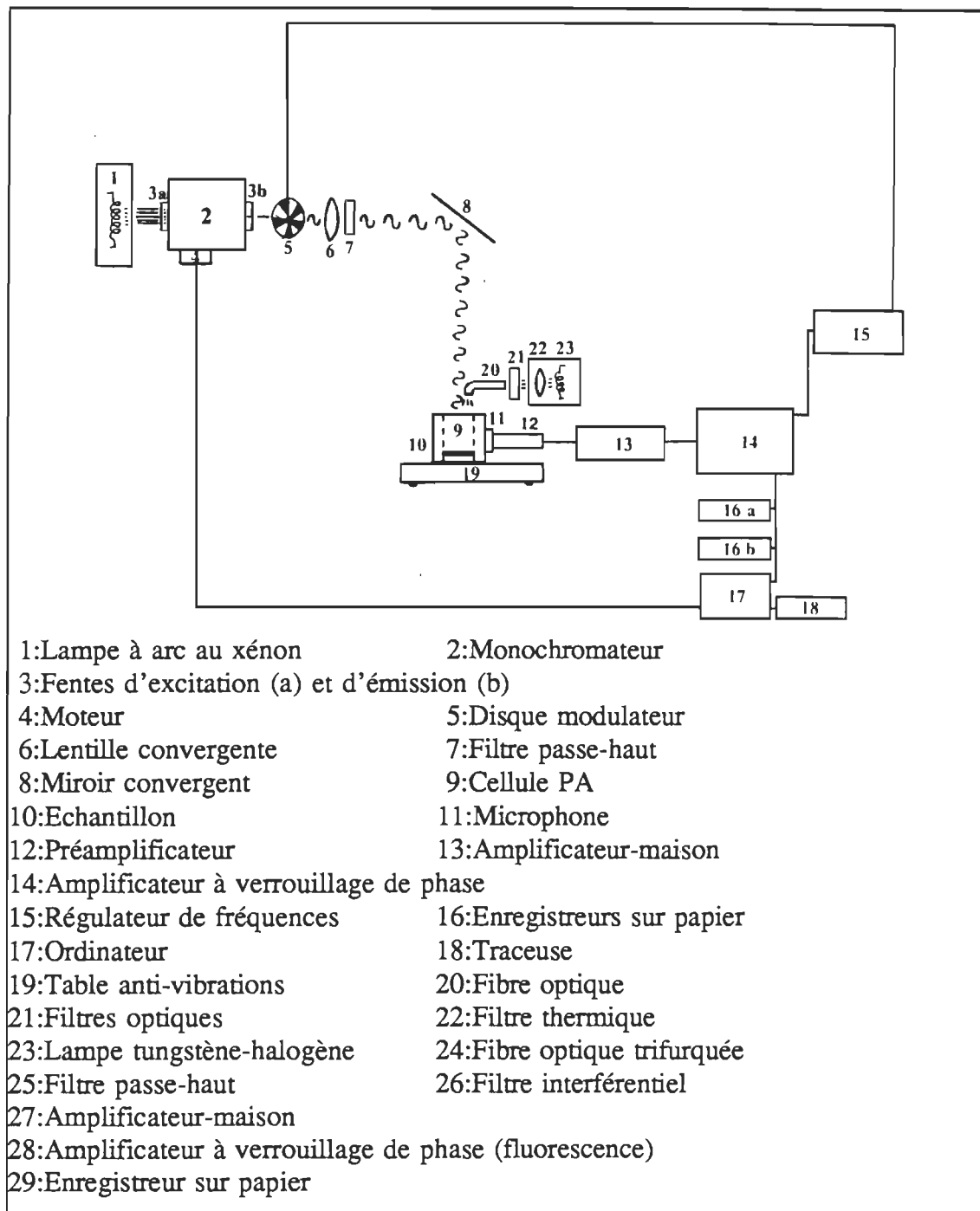
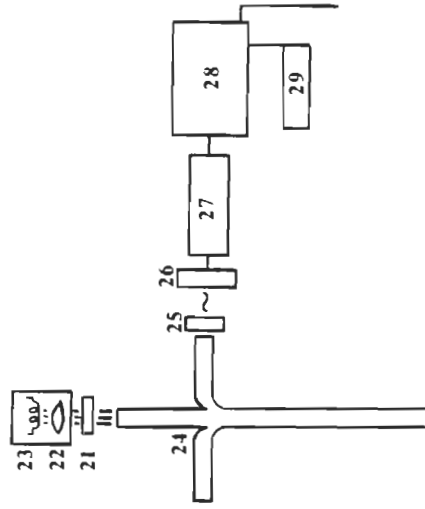


Figure 13: A-Les composantes du spectromètre photoacoustique. B-Modifications apportées lors des mesures simultanées de fluorescence et de photoacoustique. (Note: la section B est escamotable!).



concave, dont la distance focale est de 15 cm, dirige le faisceau lumineux vers la cellule photoacoustique.

Alors que la majorité des composantes du spectromètre se retrouve chez les compagnies spécialisées, la cellule photoacoustique a été fabriquée dans nos laboratoires (Ducharme *et al.*, 1979, Goulet, 1983). La cellule est composée de deux grandes parties: (i) La section supérieure, amovible, constitue la fenêtre par laquelle le faisceau d'analyse est dirigé vers l'échantillon. (ii) La base de la cellule supporte l'échantillon et comprend le microphone.

Lorsque la fenêtre est hermétiquement refermée, l'enceinte acoustique comprend quelques 250 à 300 mm³ (cylindre d'un diamètre de 18 mm environ), espace suffisant pour accueillir l'échantillon. Suite à l'excitation de l'échantillon, l'onde acoustique générée dans l'enceinte acoustique est détectée, via un fin conduit, par un microphone. La cellule photoacoustique est isolée des vibrations extérieures par une table anti-vibrations (modèle TLI-386 de Technilab Instruments Inc., Pequannock, NJ).

Le microphone de type condensateur-électret (modèle 1971-9601, General Radio Company, Concord, MA) transforme le signal acoustique en signal électrique. Celui-ci est par la suite préamplifié (amplificateur modèle 1972-9600, General Radio Company, Concord, MA), puis amplifié (d'un facteur de 100 par un amplificateur-maison [Ducharme (1979)]) avant d'être transmis à un amplificateur à verrouillage de phase (modèle 393 d'Ithaco-Dynatrac, Ithaca, NY) où les composantes d'amplitude et de phase sont analysées. Les données en phase et en quadrature du signal sont ensuite directement tracées sur papier par un enregistreur (modèle 555-0000 de Linear, Reno,

NE), ou sont emmagasinées *via* un ordinateur (modèle Apple IIe d'Apple, Cupertino, CA) en vue d'un traitement ultérieur.

L'ordinateur contrôle aussi la prise de spectres photoacoustiques. Dans ces conditions, l'ordinateur dirige un moteur, ce qui détermine la vitesse de déroulement des longueurs d'onde du monochromateur, et le positionnement du filtre passe-haut. Sauf indications contraires, les spectres photoacoustiques ont été effectués de 750 à 350 nm, à une vitesse de 50 nm min⁻¹ et une constante de temps de 1,25 s. Les spectres sont enregistrés sur un disque souple et éventuellement tracés *via* une table traçante (modèle Hiplot de Houston Instruments, Austin, TX).

Lorsque les mesures photoacoustiques visent à mesurer l'activité photosynthétique, l'emploi d'un faisceau saturant la photosynthèse se révèle nécessaire. Le faisceau saturant provient d'une ampoule de type tungstène-halogène (modèle EKE, Sylvania). Le faisceau blanc, continu, passe dans un filtre thermique (Ealing Electro-Optics, Holliston, MA) puis est amené au-dessus de la cellule photoacoustique par une fibre optique (Oriel Optics, Stratford, CO). Il est possible de régler l'intensité du faisceau saturant via un commutateur (fabriqué au laboratoire) ou par l'emploi de filtres de densité neutre (Laser Energy Inc., Rochester, NY). L'intensité lumineuse du faisceau saturant généralement utilisée est de 300 W m⁻².

Nous avons aussi transformé la qualité de lumière continue incidente en ajoutant, au besoin, différents filtres optiques entre la lampe et la fibre optique. La lumière dans le domaine du rouge lointain, utilisée dans les mesures de transitions d'état et dans la détermination de l'activité du PS I est réalisée en plaçant les filtres optiques GG427,

OG560, RG645 et RG715 (Ealing Electro-Optics, Watford, UK) sur le parcours lumineux et en retirant le filtre thermique (le spectre est présenté à la figure 14). Les trois premiers filtres sont présents afin de protéger le filtre RG715 d'une surchauffe excessive (et éventuellement du bris).

Lors des mesures simultanées de fluorescence et de SPA, un filtre Corning bleu-vert (modèle CS4-96 d'Ealing Electro-Optics, Watford, UK) est installé devant le faisceau saturant, afin d'enlever le domaine du rouge à l'infra-rouge de la lampe; évitant ainsi une éventuelle interférence avec l'émission de fluorescence de la chlorophylle (spectre présenté à la figure 14).

Le montage de l'appareil photoacoustique est légèrement modifié lorsque nous effectuons des mesures simultanées de fluorescence et de SPA (figure 13-B). Une fibre optique trifurquée (modèle 77536 d'Oriel Optics, Stratford, CO) est installée au-dessus de la cellule. La première branche recueille le faisceau modulé suite à son passage au

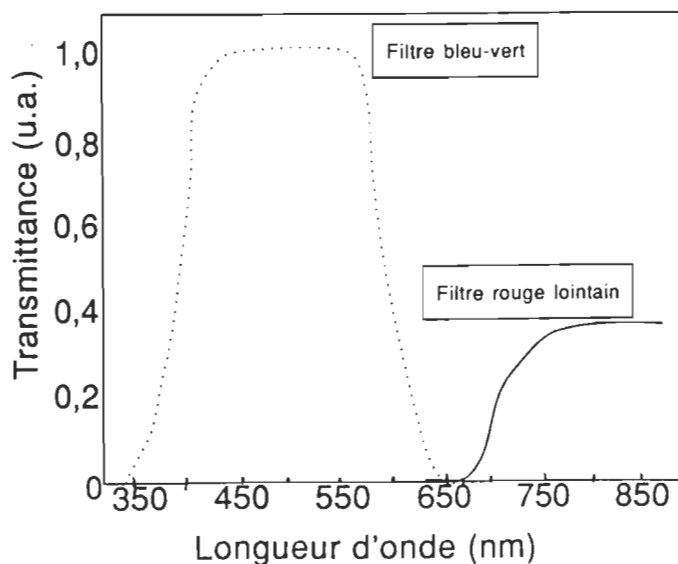


Figure 14: Spectres de transmittance des filtres utilisés lors des mesures PA.

travers du filtre passe-haut décrit ci-haut et d'une lentille convergente ($f = 10$ cm). La seconde branche transmet la lumière en provenance du faisceau saturant (le même que lors des mesures PA usuelles). Quant à la troisième branche, elle collecte la lumière en provenance de l'échantillon pour la diriger vers le système de détection de fluorescence.

Ce système est composé d'un filtre optique passe-haut (modèle RG715 d'Ealing Electro-Optics, Watford, UK), d'un filtre interférentiel à 730 nm (modèle 21248 de Ditrac, Hudson, MA) et d'un photodétecteur (modèle PIN-10D d'United Detector Technology, Santa Monica, CA). Le signal électrique en provenance du photodétecteur est transformé (convertisseur courant-voltage fabriqué au laboratoire) et envoyé à un amplificateur à verrouillage de phase (modèle 5208 d'EG&G, Princeton, NJ). Le signal de fluorescence modulée est ensuite envoyé à un enregistreur sur papier (modèle 555-0000 de Linear).

Les mesures d'intensité lumineuse ont été effectuées à l'aide d'un photomètre (modèle LI-189 de LI-COR, Inc., Lincoln, NE). Dans le cas des mesures d'intensité lumineuse pour le faisceau continu rouge lointain, l'intensité était mesurée à l'aide d'une cellule photodétectrice (construite au laboratoire) étalonnée grâce à un pyranomètre.

2.2.2 Mesures photoacoustiques

Lors des mesures photoacoustiques, un disque de feuille de 1,8 cm de diamètre est prélevé sur la plante grâce à un poinçon spécialement fabriqué. Le disque de feuille est ensuite placé sur 3 lamelles circulaires de microscope (modèle 12-546 de Fischer Scientific Co., Montréal, Québec) à l'intérieur de l'enceinte acoustique.

3.3 Le spectrofluorimètre

3.3.1 Description de l'appareil

L'émission de fluorescence continue est induite et enregistrée à l'aide d'un spectrofluorimètre (modèle Datamate de Spex Industries, Metuchen, NJ). Une description plus détaillée de l'appareil peut être retrouvée dans le mémoire de Galland (1990).

Une lampe au xénon produit un faisceau d'excitation qui devient monochromatique suite à son passage à l'intérieur d'un monochromateur. Un filtre passe-haut (KV 399) est placé sur le parcours lumineux afin d'enlever la composante ultraviolette. Le faisceau est par la suite scindé afin d'exciter i-une solution de Rhodamine-B, qui constitue la référence et ii-l'échantillon. Suite à l'excitation des pigments de l'échantillon, l'émission de fluorescence est dirigée vers un filtre optique passe-haut (KV599), puis vers un second monochromateur et finalement vers le détecteur. Le signal est alors amplifié, puis transmis à l'ordinateur pour des traitements ultérieurs.

L'échantillon est un disque de feuille de 1,8 cm de diamètre placé verticalement entre deux lames de microscope (modèle 12-552 de Fischer Scientific Co., Montréal, Québec). L'excitation s'effectue à un angle de 45°, alors que la détection est frontale, afin de minimiser la quantité de lumière incidente diffuse détectée lors de nos mesures.

3.3.2 Mesures de fluorescence

Deux types de mesures sont effectuées avec le spectrofluorimètre: i-des cinétiques d'émission dans le temps et ii-des spectres d'émission et d'excitation. Dans les deux cas, les mesures sont effectuées à la température de la pièce.

Les cinétiques d'émission de fluorescence (effet Kautsky) constituent une mesure du potentiel de l'appareil photosynthétique à répondre à l'excitation lumineuse (Lichtenthaler et Rinderle, 1988). Le disque de feuille est prélevé, puis placé à l'obscurité dans le porte-échantillon pendant 15 min. Le disque est ensuite soudainement illuminé, et la cinétique de fluorescence induite est enregistrée pendant 5 min, laps de temps suffisant afin d'obtenir une intensité de fluorescence constante. L'excitation est produite par un faisceau lumineux de 470 nm et l'émission est déterminée à 685 nm.

Les spectres d'émission et d'excitation servent à déterminer la présence de certains pigments et à suivre les transferts énergétiques entre ceux-ci (Seely et Connolly, 1986, Murata et Satoh, 1986). Les spectres d'émission sont réalisés en conservant une longueur d'onde d'excitation constante ($\lambda=470$ nm) et en balayant un domaine de 550 à 800 nm. Le rapport des bandes F685/F735 nous donne une idée de la distribution d'énergie entre les photosystèmes (Lichtenthaler et Rinderle, 1988). Quant aux spectres d'excitation, la longueur d'onde d'émission est conservée constante à 685 ou 740 nm (pics d'émission maximale dans de nos feuilles) selon le cas, et le spectre de 400 à 600 nm est balayé.

3.4 Le matériel végétal

3.4.1 L'érable à sucre

L'érable à sucre (*Acer saccharum* Marsh.) a été choisi comme plante expérimentale en raison de son type écologique. En effet, l'érable à sucre est une espèce dite de climax (Marie-Victorin, 1964), dont les jeunes plants croissent à l'ombre des arbres dominants d'une forêt.

Nous avons utilisé deux catégories de plants: des semis âgés de 4 à 6 mois et des plantules âgées de 7 ± 2 ans.

Les semis croissent à partir de graines gracieusement fournies par l'Institut Forestier National de Petawawa (Chalk River, Ontario). Une description plus détaillée des conditions de croissance des semis peut être retrouvée dans la thèse de Charlebois (communication personnelle, 1993). En résumé, disons que les graines sont mises à tremper pendant une dizaine de jours dans de l'eau distillée changée quotidiennement, puis mises en stratification (à 4°C, à l'obscurité sur un lit de sable humide) de trois à quatre mois. Les cotylédons sont ensuite transplantés dans un mélange de terre (Premier de Premier Peat Moss Inc, Rivière-du-Loup, Québec): sable: vermiculite: tourbe de sphaigne (4:1:1:1, v:v). Ils sont arrosés à l'eau du robinet à tous les quatre ou cinq jours; deux fois par mois, un fertilisant pour jeunes plants (type 11-41-8 de Plant Products Co., Brompton, Ont), à raison de 2 g l⁻¹ est ajouté à l'eau d'arrosage. Les semis sont installés à l'intérieur d'une chambre de croissance sous des conditions

constantes ($T = 22 \pm 3$ °C, 50 ± 10 % humidité). La photopériode est réglée à 14 h jour/ 10 h nuit, et les semis croissent sous une intensité d'environ $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Les plantules d'érable à sucre sont récoltés à la pépinière expérimentale du gouvernement du Québec sise à Berthierville. Les plantules, mesurant environ 90 cm, sont transplantés au printemps (en mai) dans la terre d'où ils sont tirés. Ils sont par la suite placés à l'extérieur, à l'ombre ($350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de six à huit semaines avant d'être utilisés afin d'assurer une acclimatation complète. Ils sont arrosés à l'eau du robinet à tous les trois ou quatre jours, tout dépendant des épisodes de pluie survenus entre les arrosages.

3.4.2 Le bleuetier

Le bleuetier (*Vaccinium angustifolium* Ait.) est une plante dite pionnière, car elle est une des premières à coloniser un site (suite à un feu de forêt par exemple). Ainsi, les plants ont à subir une exposition à la lumière continue, ce qui, nous l'espérons, devrait augmenter l'efficacité de leurs mécanismes de protection contre la photoinhibition (par rapport à l'érable à sucre).

Les plants de bleuetier choisis pour l'expérimentation à l'été 1991 croissent de façon naturelle sur le campus de l'université. Des plants sont sélectionnés dans des régions ombragées alors que les autres sont situés en pleins champs afin d'offrir une diversité dans l'acclimatation lumineuse.

3.4.3 Les autres plantes

Différentes plantes ont été choisies comme sujets d'expérience à un moment ou l'autre de ce travail parce qu'elles présentaient certaines caractéristiques d'intérêt.

Des plants de fraisier (*Fragaria virginiana* Duchesne) ont été choisis pour la facilité que nous avons à les infiltrer d'eau. La pubescence de leurs feuilles constitue une autre caractéristique afin de démontrer l'intérêt de ce type de mesures. Ils sont transplantés dans le mélange de terre, puis croissent dans la chambre de croissance, sous une intensité de $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Le plant de pois (*Pisum sativum* L. var. Snowpea ou Petite Merveille), une espèce bien caractérisée dans les études sur la photosynthèse, a aussi été utilisé. Les plants ont crû dans la chambre de croissance, sous une intensité de $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.5 L'infiltration d'eau

Les disques de feuilles sont infiltrés sous vide selon la procédure suivante (Malkin *et al.*, 1992): Un disque de feuille est placé à l'intérieur d'une seringue en plastique de 10 ml, dont on a pris soin d'enlever l'aiguille (!). La seringue est remplie à la moitié environ avec de l'eau ou une solution-tampon appropriée. La seringue est alors retournée et le piston est comprimé afin d'enlever l'air présent. L'extrémité de la seringue est fermement bouchée avec le pouce, puis le piston est retiré partiellement, ce qui crée un vide appréciable à l'intérieur de la seringue. A ce moment, il est possible de voir des bulles se former à la surface du disque de feuille, bulles liées à la sortie de l'air

des espaces aérifères de celle-ci. La seringue est secouée pendant quelques secondes, tout en maintenant ce vide partiel. Le piston est ensuite relâché brusquement et retourne très rapidement à sa position initiale. Cette étape est cruciale pour réaliser efficacement l'infiltration. La restauration rapide de la pression ambiante à l'intérieur de la seringue fait entrer l'eau à l'intérieur du disque de feuille. La réussite de l'infiltration est très facilement observable puisque la feuille devient transparente. Si des sections du disque de feuille n'ont pas été infiltrées efficacement, la même procédure est appliquée de nouveau.

De façon routinière, trois répétitions de l'infiltration ont été effectuées afin d'assurer une complète infiltration; les résultats photoacoustiques étant très sensibles à de minimes quantités d'air résiduel dans les espaces aérifères. Il faut ajouter que les différentes plantes utilisées ne présentent pas toutes la même facilité à être infiltrées. Les feuilles de fraisier et de pois se révèlent faciles à infiltrer. Par contre, les feuilles d'érable à sucre sont plus difficiles, particulièrement les plus âgées, qui présentent une cuticule plus épaisse. Nous avons aussi constaté qu'une pré-illumination d'environ 15 min des feuilles augmentait la réussite de l'infiltration.

3.6 Le traitement photoinhibiteur

Le traitement photoinhibiteur consiste en l'exposition d'une feuille complète de la plante à une haute intensité lumineuse. Un soin particulier a été apporté afin que les feuilles exposées soient encore rattachées au plant d'origine, afin de minimiser le stress du détachement (Potvin, 1985) et de préserver des conditions naturelles d'hydratation, entre autres. Dans le cas des plants de bleuetier, une branche est prélevée, puis coupée

en biseau sous l'eau, afin d'éviter la formation de bulles d'air dans les vaisseaux du xylème, assurant ainsi une hydratation adéquate des feuilles.

Le montage expérimental est simple. La source lumineuse est constituée d'une lampe de projecteur à diapositives (modèle EKE, Sylvania). La lumière émise traverse un bac de 8 cm d'eau, afin d'éliminer la région infra-rouge du spectre, ce qui prévient un éventuel stress thermique. L'intensité de la lumière atteignant la feuille a été estimée à 70 000 ou 100 000 lux, selon le cas, par un photomètre (modèle EC1, Optikon). Le traitement dure généralement 1 h.

L'effet du traitement photoinhibiteur est évalué en comparant un échantillon-témoin, prélevé avant le traitement, à un échantillon traité, ayant subi le traitement de haute intensité lumineuse. Chez les feuilles d'érable, les deux échantillons proviennent de la même feuille, mais sont prélevés de part et d'autre de la nervure centrale. Lors d'études préliminaires, nous n'avons pas observé de variations des paramètres à l'étude à l'intérieur de la période d'exposition (mais sans traitement photoinhibiteur). Chez les feuilles de bleuetier, la troisième feuille à partir de l'apex est utilisée comme témoin, la quatrième subit le traitement. Nous n'avons pas mesuré de différences entre les divers paramètres entre ces deux feuilles lors de mesures préliminaires.

3.7 L'analyse pigmentaire

Dans un premier temps, nous voulons déterminer de façon grossière si le traitement photoinhibiteur affecte la concentration des principaux pigments de la feuille. Une

comparaison des pigments entre des feuilles avant et après le traitement photoinhibiteur a donc été effectuée.

Le disque de feuille est broyé dans du sable fin dans quelques ml d'une solution acétone:eau (80:20). Le contenu est transféré dans une éprouvette et le mortier est rincé avec la solution. Ces étapes se déroulent à 4 °C, sous une lumière verte, afin d'éviter la dégradation des pigments. Par la suite, la solution est centrifugée à l'intérieur d'une centrifugeuse clinique (modèle CL428, International Equipment Co, Needham Heights, MA) à degré 5 (ce qui correspond à environ 2 250 rpm) pendant 10 min. Le surnageant est recueilli, puis le volume ajusté à 10 ml. Les mesures d'absorbance sont effectuées grâce à un spectromètre (modèle 553 de Perkin-Elmer Corporation, Oak Brook, IL).

Les longueurs d'onde choisies (470, 646,8 et 663,2 nm), les coefficients d'absorption utilisés et les équations nécessaires à la quantification des différents pigments sont tirés de Lichtenthaler (1987).

$$C_{chl a} = 12,25.A_{663,2nm} - 2,79.A_{646,8nm} \quad (17)$$

$$C_{chl b} = 21,50.A_{646,8nm} - 5,10.A_{663,2nm} \quad (18)$$

$$C_{chl totales} = 7,15.A_{663,2nm} - 18,71.A_{646,8nm} \quad (19)$$

$$C_{\text{caroténoïdes}} = \frac{1000.A_{470nm} - 1,82.C_{chl a} - 85,02.C_{chl b}}{198} \quad (20)$$

Les quantités obtenues sont ensuite transformées afin de les exprimer en relation avec l'aire ou la masse fraîche de l'échantillon, des données couramment utilisées en physiologie végétale. Dans le cas où le disque de feuille possède une surface inférieure à 2,54 cm² (taille d'un échantillon circulaire utilisé lors des mesures PA), l'aire est évaluée par la méthode suivante: on dessine les contours du disque de feuille sur une feuille de papier, on découpe ce dessin, on le pèse, puis on compare sa masse avec celle d'un morceau du même papier d'aire connue.

CHAPITRE 4

LE SIGNAL PHOTOACOUSTIQUE DANS LES FEUILLES

Comme il a déjà été mentionné dans le chapitre concernant la spectroscopie photoacoustique, le signal PA de feuilles origine de trois contributions: (i) une contribution photothermique qui provient des désexcitations non-radiatives des pigments, (ii) une d'emmagasiner d'énergie photosynthétique et (iii) une contribution d'O₂, les deux dernières étant liées à l'activité photosynthétique des deux photosystèmes.

Ce chapitre vise à présenter les études entreprises sur la caractérisation des différentes contributions du signal PA. Le contenu peut sembler un peu éloigné de mes études sur les effets de la lumière sur l'activité photosynthétique, mais les résultats obtenus ont influencé certaines avenues ultérieures de travail.

Ainsi, la première partie du présent chapitre porte sur la caractérisation du signal PA d'oxygène. Dès le début de ce travail, nous nous sommes heurtés à un phénomène nouveau, à savoir, une chute du signal d'oxygène se produisant en état stationnaire. Nous avons donc tenté de cerner les causes de ce phénomène en variant différents paramètres PA (fréquence de modulation, intensité lumineuse modulée, longueur d'onde d'excitation, etc...) et en analysant leur effet sur la chute du signal PA. La conclusion tirée de ce travail, à l'effet que le signal PA d'O₂ pouvait se révéler porteur de contributions autres que le dégagement d'O₂ photosynthétique, doit donc rendre très prudent quant à l'utilisation de ce paramètre PA. Ceci nous a donc obligé à utiliser l'EEP comme indicateur de l'activité photosynthétique.

Mais la mesure de l'EEP ne peut généralement s'effectuer qu'à des fréquences de modulation élevées, où le rapport signal/bruit s'avère faible. En vue d'augmenter ce rapport, nous avons développé une méthodologie d'infiltration d'eau des feuilles ce qui, en enlevant la contribution d'O₂ à faible fréquence de modulation, permet une mesure fiable de l'EEP. De cette façon, nous pourrions utiliser cette méthodologie afin d'évaluer l'effet de différents modulateurs de l'activité photosynthétique (DCMU, NaF au chapitre 5) dans des conditions se rapprochant de celles prévalant *in vivo*.

4.1 Le signal photoacoustique d'oxygène

En se servant de la méthode de résolution des contributions du signal PA de feuilles développée par Poulet *et al.* (1983), il devient possible de suivre l'évolution dans le temps du signal d'O₂. En effet, suite aux ajustements de phase (voir section 2.3.3, page 73), la composante du signal PA en quadrature est formée du signal d'O₂ uniquement, alors que la composante en phase comporte le signal photothermique et le signal d'O₂. Nous avons utilisé cette méthodologie afin d'étudier le signal d'O₂ de feuilles.

Lorsqu'un disque de feuille d'érable à sucre est placé dans la cellule PA, et est illuminé par le faisceau modulé seulement, une chute du signal est observée après quelques minutes (figure 15). Cette diminution suit de quelques minutes l'apparition d'un plateau, plateau que nous rencontrons habituellement dans les mesures (Charland, 1989). Il est à noter que le taux de diminution du signal PA d'O₂ présenté dans cette figure se révèle exceptionnel; le taux étant généralement inférieur, comme nous le verrons dans les prochaines figures. Suite à l'établissement d'un état stationnaire diminué, nous pouvons remarquer que l'application du faisceau saturant engendre un signal PA en qua-

drature initialement négatif (ce qui est relié à une consommation d' O_2 par le PS I selon Malkin (1987) qui se stabilise à un niveau égal à zéro par la suite. Nous verrons un peu plus loin que cette hypothèse ne peut s'appliquer dans le cas qui nous intéresse ici.

Il se révèle fort intéressant de constater que l'application périodique du faisceau saturant prévient cette chute du signal PA (figure 16-A). De plus, le signal PA peut être restauré, en tout ou en partie, si le faisceau saturant illumine l'échantillon pendant (figure 16-B) ou à la fin (figure 16-C), respectivement, de la diminution du signal PA.

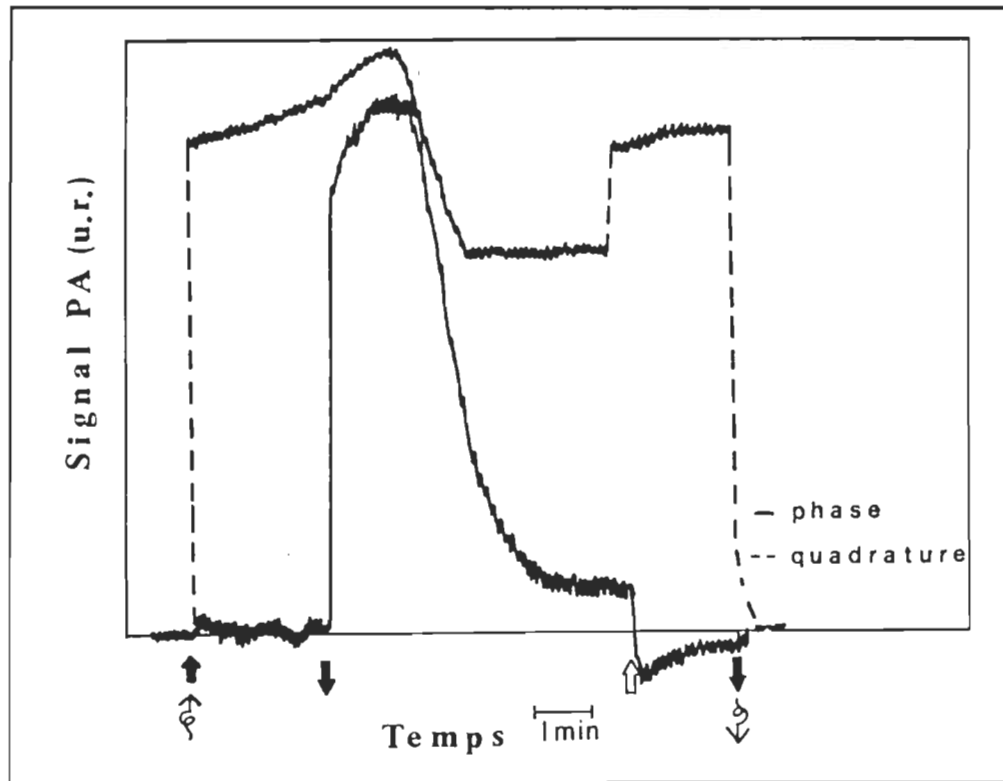


Figure 15: Variation du signal PA d'une feuille d'érable à sucre dans le temps. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (470 nm , 7 W m^{-2} , 25 Hz); les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc (150 W m^{-2}).

Ainsi, cette diminution du signal d' O_2 n'est pas reliée à une baisse de l'activité photosynthétique, baisse qui serait induite par une baisse de la concentration du CO_2 présent dans la cellule PA. Le fait qu'il soit possible de conserver le signal d' O_2 pendant un bon moment, en appliquant régulièrement le faisceau saturant, supporte cette hypothèse. Généralement, les mesures PA sont effectuées à une concentration en CO_2 que l'on

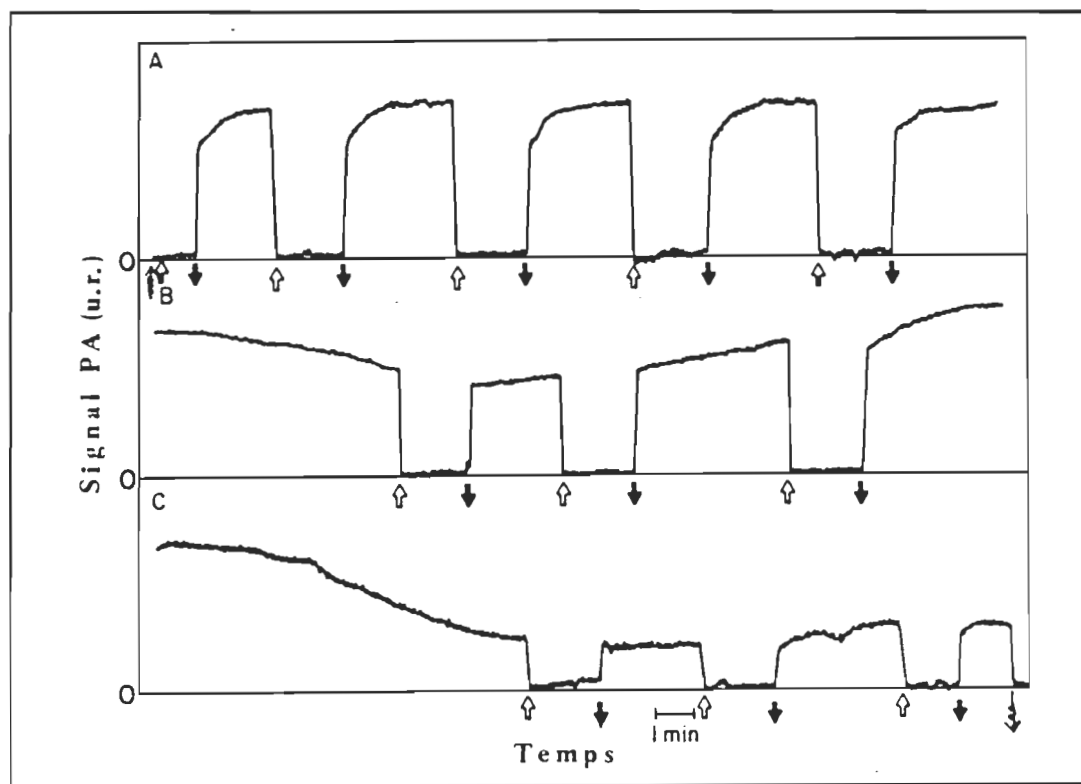


Figure 16: Variation du signal PA en phase (représentant la composante en phase dans le temps de la contribution d' O_2 seulement) de trois échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. Le faisceau saturant est appliqué A-à intervalles réguliers, B- pendant la chute du signal PA et C-à la fin de la chute du signal PA. Conditions similaires à celles de la figure 15, sauf λ : 640 nm. Symboles similaires à ceux de la figure 15.

estime voisine de celle du point de compensation⁸, puisque nous nous retrouvons dans un milieu fermé, donc rapidement à l'équilibre. Sous ces conditions, l'activité photosynthétique n'est pas maximale.

Néanmoins, nous avons vérifié l'activité photosynthétique *via* deux autres méthodes: la mesure de l'EEP et de la fluorescence, deux méthodologies reconnues pour indiquer l'état de fonctionnement de l'appareil photosynthétique (Bults *et al.*, 1982, Schreiber *et al.*, 1989). Pendant la baisse du signal d'O₂, le signal de fluorescence mesuré simultanément demeure constant, signe d'une activité photosynthétique régulière (figure 17). La mesure de l'EEP (figure 17), effectuée concurremment à la mesure du signal d'O₂ montre un signal thermique stable, ce qui nous montre encore ici une activité inchangée. Ainsi, la baisse du signal d'O₂ n'est pas reliée à une diminution de l'activité photosynthétique de dégagement d'O₂.

Lorsque l'évolution du signal PA dans le temps est schématisée, nous constatons que le signal PA ne varie pas seulement en amplitude, mais aussi en orientation (figure 18). Le vecteur relié à l'O₂ se trouve à effectuer une légère rotation, tout en diminuant d'intensité. Ceci suggère qu'une troisième contribution entrerait en jeu dans la description du signal.

⁸ Le point de compensation se révèle être la concentration ambiante en CO₂ où l'activité photosynthétique (consommation de CO₂) s'avère égale à celle des mécanismes de production de CO₂ (surtout la respiration). La concentration ambiante de CO₂ ne varie pas lors de telles mesures.

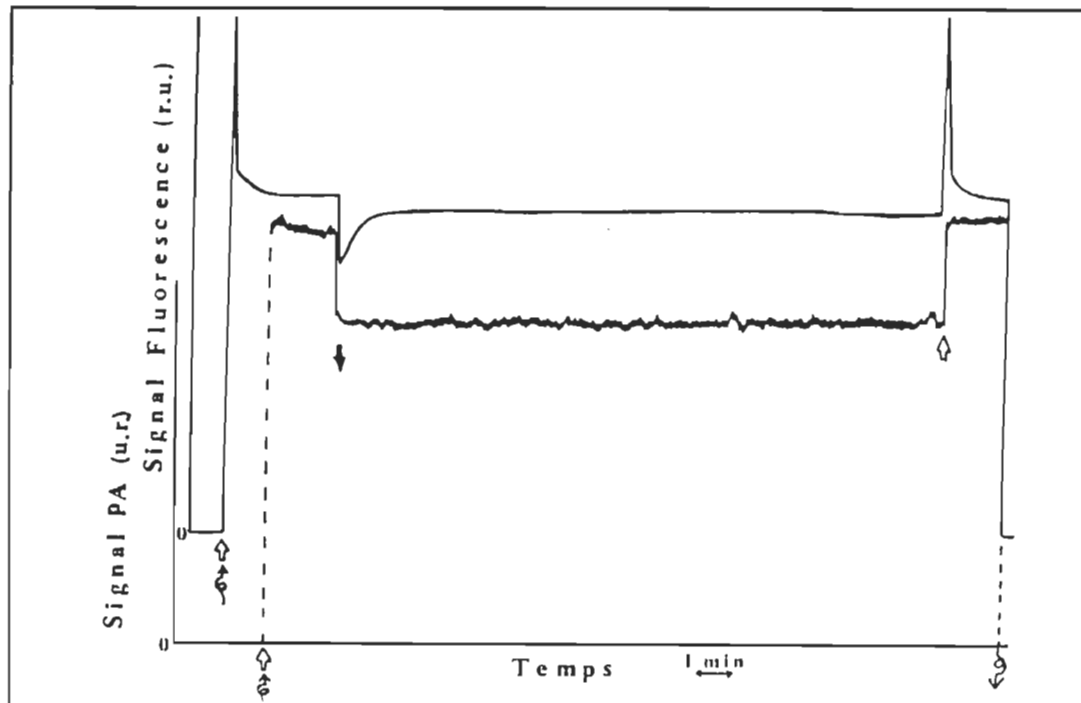


Figure 17: Variation des signaux de fluorescence modulée (---) et de photoacoustique (--) d'une feuille d'érable à sucre dans le temps. Conditions similaires à celles de la figure 16 sauf f_{mod} : 110 Hz; symboles similaires à ceux de la figure 15.

Comme l'activité photosynthétique demeure constante, la diminution du signal d' O_2 pourrait être attribuée à des mécanismes de consommation d' O_2 . Jusqu'à maintenant, il a été démontré que des mécanismes photochimiques de consommation d' O_2 pouvaient être détectés en SPA lors de l'induction photosynthétique (Malkin, 1987) ou chez des feuilles ayant subi un stress de hautes températures (Havaux *et al.*, 1987 c). Le principal mécanisme expliquant cette prise d' O_2 était la réaction de Mehler, la photoréduction de l' O_2 par le PS I (Havaux *et al.*, 1987 c).

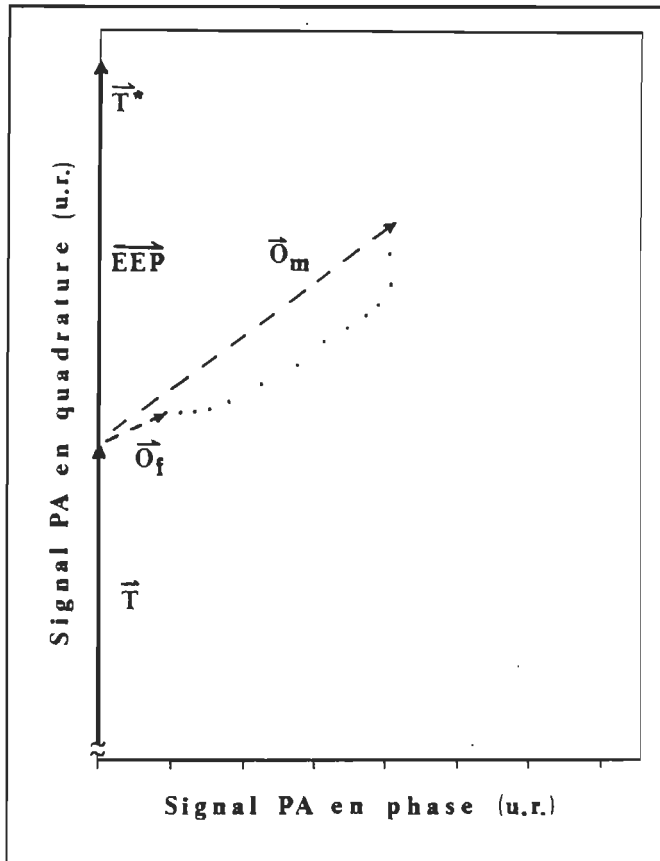


Figure 18: Représentation vectorielle des contributions du signal PA dans le temps.

(—) Contribution photothermique maximale ($T^* = T + EEP$); (- -) Contribution d' O_2 maximale (O_m); (....) Extrémité du vecteur de la contribution d' O_2 dans le temps jusqu'à la valeur finale (O_f), l'intervalle entre chaque point est d'une min. Conditions similaires à celles de la figure 16.

En vue de vérifier cette hypothèse, nous avons illuminé l'échantillon avec un faisceau saturant dans le domaine du rouge lointain ($\lambda > 715$ nm). Cette lumière est absorbée par le PS I, ce qui devrait saturer la consommation modulée d' O_2 . En présence de ce faisceau rouge lointain, le signal d' O_2 augmente (figure 19), probablement à cause d'une redistribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Canaani et Malkin, 1984 a).

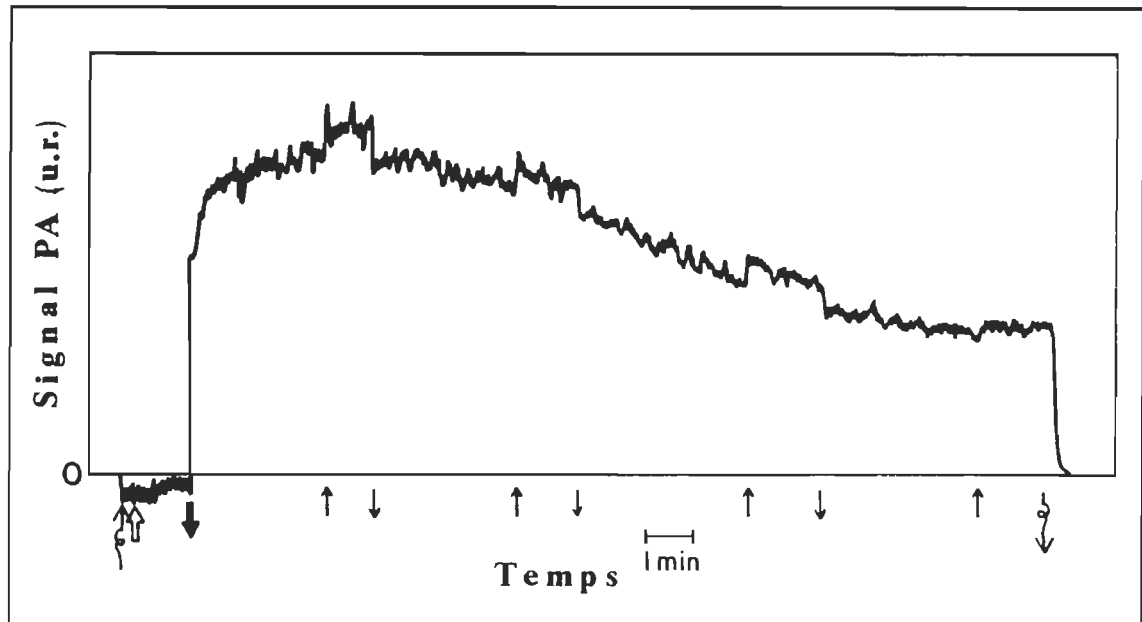


Figure 19: Effet de l'illumination d'un faisceau saturant rouge lointain sur la variation du signal PA en quadrature dans le temps d'une feuille d'érable à sucre. Conditions similaires à celle de la figure 15, sauf λ : 650 nm. Les flèches fines pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction respectivement, du faisceau saturant rouge lointain ($\lambda > 715$ nm, 150 W m^{-2}). Les autres symboles sont similaires à ceux de la figure 15.

Lorsque la diminution du signal d' O_2 est amorcée, l'application du faisceau saturant rouge lointain permet une certaine augmentation du signal d' O_2 , mais sans réussir à atteindre le niveau initial. Au surplus, la chute du signal d' O_2 se poursuit, avec un taux de décroissance similaire, pendant l'application du faisceau rouge lointain. Ceci nous porte à croire que la baisse du signal d' O_2 ne peut être attribuée à une consommation photochimique modulée par le PS I, comme cela était le cas chez le tabac (Havaux *et al.*, 1987c).

Afin de mieux caractériser cette chute du signal d'O₂, nous avons vérifié l'effet de différents paramètres PA sur l'évolution du signal d'O₂ dans le temps. L'effet de l'intensité du faisceau modulé a d'abord été étudié sur des disques extraits de la même feuille, afin d'éviter des variations trop importantes entre les échantillons. Un disque de feuille illuminé avec un faisceau modulé de faible intensité montre une baisse du signal d'O₂ se produisant plus rapidement et ayant une intensité relative (par rapport au plateau) plus prononcée qu'un autre disque illuminé avec un faisceau modulé d'intensité supérieure (figure 20). Un comportement similaire est observé chez des feuilles de pois (résultat non-présenté), d'orge et de tabac (Canaani et Malkin, 1984 b).

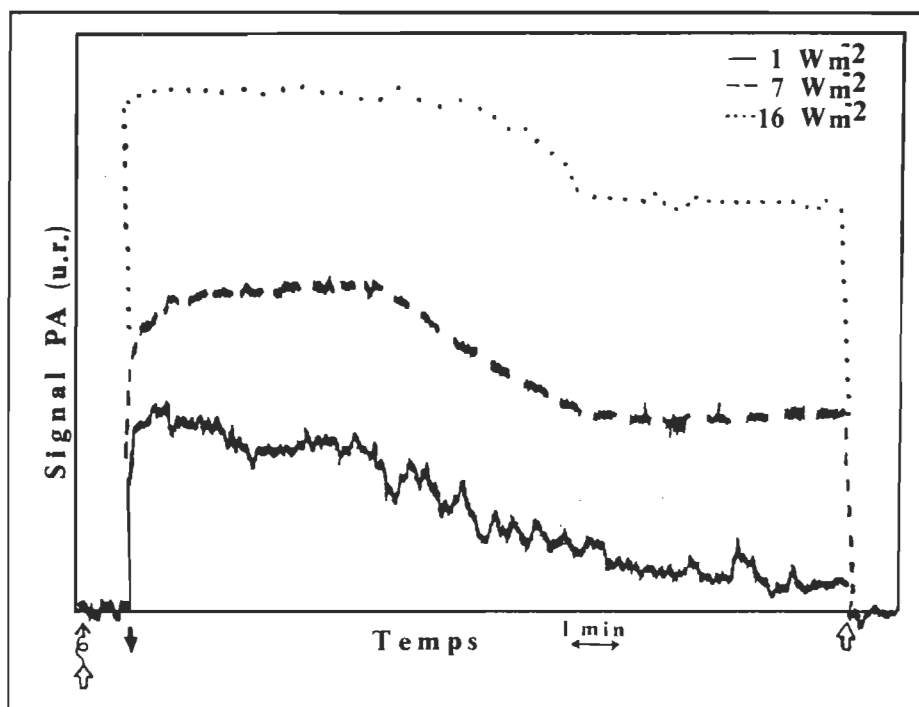


Figure 20: Effet de l'intensité du faisceau modulé sur la variation du signal PA en phase dans le temps de trois différents échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. Faisceau modulé: 640 nm, 15 Hz, (—) 1 W m⁻², (- -) 7 W m⁻², (...) 16 W m⁻²; faisceau saturant blanc: 350 W m⁻². Symboles similaires à ceux de la figure 15.

Ces observations indiquent que le taux de la baisse du signal d'O₂, ainsi que son importance, dépendent du taux de photochimie modulée. Plus l'activité photosynthétique est élevée, plus importante sera la contribution d'O₂ en provenance des thylacoïdes vers leur environnement (stroma et cytoplasme). Ce dégagement d'O₂ peut, s'il est suffisamment élevé, réduire, voire éviter, l'effet négatif des mécanismes de consommation d'O₂ sur le signal PA.

L'évolution du signal d'O₂ dans le temps se révèle fort différente selon la fréquence de modulation utilisée (figure 21). La baisse du signal d'O₂ se révèle plus hâtive et plus importante lorsque la fréquence de modulation est faible. A 80 Hz, cette diminution est à toute fin pratique éliminée. Le fait que la baisse soit maximale aux basses fréquences de modulation suggère que des mécanismes de consommation d'O₂ lents, tels l'oxygénation du ribulose 1,5-diphosphate par la Rubisco, la photorespiration et la respiration, pourraient être impliqués dans la baisse du signal d'O₂ dans ces conditions. De plus, aux hautes fréquences de modulation, seul l'O₂ dégagé par les chloroplastes situés près de la membrane cellulaire peut contribuer au signal PA, ce qui empêcherait l'effet négatif des autres mécanismes de consommation d'O₂.

En fait, l'O₂ dégagé par les membranes thylacoïdiennes doit diffuser au travers du stroma, puis du cytoplasme cellulaire jusqu'à la surface de la cellule afin de générer le signal photoacoustique. A la surface de la cellule, l'O₂ modulé cause des fluctuations de la pression, qui sont transmises à la surface du disque de feuille *via* les espaces aérifères ou la couche épidermale flexible. Tout ce cheminement comporte plusieurs mécanismes-puits pour l'O₂, tels l'oxygénation du ribulose 1,5-diphosphate par la Rubisco, la réaction de Mehler, la photorespiration et la respiration.

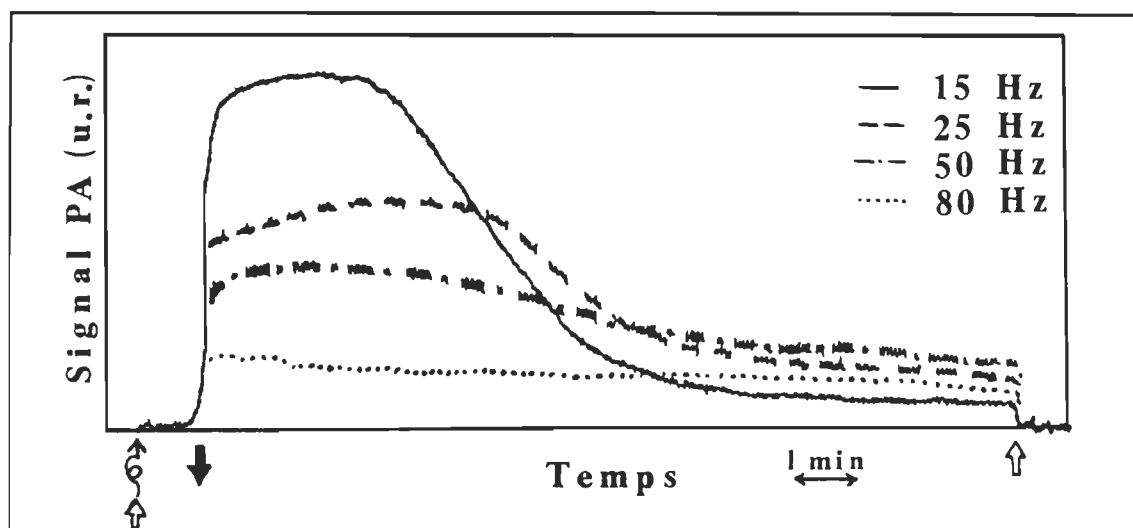


Figure 21: Effet de la fréquence de modulation sur la variation du signal PA en phase dans le temps de quatre échantillons prélevés sur la même feuille d'érable à sucre. (—) 15 Hz, (- -) 25 Hz, (- · -) 50 Hz, (····) 80 Hz. Autres conditions similaires à celles de la figure 16. Symboles similaires à ceux de la figure 15.

Considérant toutes ces données, la baisse du signal d'O₂ dans le temps peut être expliquée de la façon suivante:

Lorsque le disque de feuille est illuminé par le faisceau saturant, l'activité photosynthétique devient maximale, ce qui conduit à un dégagement d'O₂ optimal⁹. Ainsi, cette grande quantité d'O₂ contribue à l'établissement d'une certaine pression partielle d'O₂ (p(O₂)) dans les cellules végétales, malgré la présence des processus de consommation.

⁹ Attention ce dégagement d'O₂, bien que maximal, n'est pas modulé! Il ne contribue donc pas au signal PA.

L'extinction du faisceau saturant ne laisse qu'une contribution modulée de dégagement d'O₂, ce qui réduit considérablement le taux de dégagement d'O₂. Dans les premières minutes consécutives à l'extinction du faisceau saturant, le signal d'O₂ atteint un plateau, probablement à cause de la grande p(O₂) et du taux de diffusion rapide de l'oxygène. Sous des conditions de grande p(O₂), nous pouvons assumer une grande activité des mécanismes de consommation d'O₂. Entre autres, il est connu que l'activité photorespiratoire augmente lorsque la concentration d'O₂ intracellulaire est élevée (Mikulska *et al.*, 1988). En augmentant le rapport O₂/CO₂ une augmentation de l'activité oxygénante de la Rubisco est aussi notée (Mikulska *et al.*, 1988). Cette grande activité consommatrice d'O₂ a pour effet de diminuer la p(O₂), puisque l'activité photosynthétique s'avère limitée. De plus, il demeure probable qu'une partie de l'O₂ dégagé est dissoute dans le stroma et le cytoplasme, afin de conserver cette p(O₂) à un certain niveau. Ceci a pour effet de diminuer la quantité d'O₂ se rendant à la surface de la cellule, d'où une baisse du signal PA.

La fin de la chute du signal PA se produit lorsque la p(O₂) est abaissée à un niveau tel que l'activité des mécanismes de consommation diminue (Canvin *et al.*, 1980, Takahashi et Asada, 1982 et Mikulska *et al.*, 1988). A quelques reprises, un deuxième cycle d'augmentation-diminution du signal PA s'est produit. Ce cycle, dont l'amplitude est inférieure à celui décrit dans les dernières lignes, peut s'expliquer par la diminution de l'activité consommatrice d'O₂. Néanmoins, le signal rediminuait par la suite au niveau de l'état stationnaire diminué. A ce niveau, un équilibre s'établit entre les activités de dégagement et de consommation d'O₂, ce qui mène à un état stationnaire du signal PA.

Au surplus, il se révèle logique d'assumer que, pendant sa diffusion hors du chloroplaste, une proportion importante d'O₂ peut atteindre les peroxisomes, reconnus pour leur proximité des chloroplastes (Vaughn, 1985, Lavergne, 1989), et les mitochondries. Ces deux organites renferment les mécanismes du glycolate et de la respiration respectivement, deux importants mécanismes consommateurs d'O₂ (Badger, 1985, Elstner, 1979). Même si ces deux mécanismes sont reconnus comme lents, d'un point de vue cinétique, une partie de l'O₂ modulée peut être perdue par leur prise dans le cytoplasme (Lavergne, 1989). Cette proportion deviendrait plus importante lorsque le dégagement d'O₂ est faible (à faible intensité du faisceau modulé).

Toutes les figures présentées ci-haut montrent un signal à l'état stationnaire supérieur à zéro, ce qui nous porte à conclure que sous ces conditions, le taux de dégagement demeure supérieur au taux de consommation. Chez certains échantillons, le signal PA à l'état stationnaire s'est révélé égal à zéro, ce qui indiquait que le taux de consommation pouvait devenir égal, sinon supérieur, au taux de dégagement d'O₂. Dans ces conditions, une augmentation de l'intensité du faisceau modulé conserve toujours comme effet d'élever le signal PA. Ceci confirme clairement que l'état stationnaire est dépendant de l'activité photochimique.

Ainsi, à partir de toutes ces observations, l'amplitude du signal PA du plateau initial peut être assimilée à une mesure du dégagement d'O₂ **brut**, alors que le niveau du signal PA dans l'état stationnaire peut être relié à une mesure du dégagement d'O₂ **net**. La différence entre l'activité brute et l'activité nette représenterait l'activité de consommation d'O₂. Il serait intéressant d'étudier la cinétique du signal d'O₂ sous des

intensités modulées très faibles. Malheureusement, le faible rapport signal/bruit devient un facteur très limitant, ce qui rend les mesures difficiles.

En conclusion, nous avons démontré dans cette section que les mécanismes de consommation d'O₂ peuvent affecter le signal modulé d'O₂ et ce, au niveau de la prise de mesure usuelle. Jusqu'à maintenant, il avait été montré que la consommation d'O₂ jouait un rôle dans la cinétique d'induction d'O₂ (Malkin, 1987) et pouvait être détectée avec la méthodologie pulsée (Mauzerall, 1990, Kolbowski *et al.*, 1990). Une grande partie de la prise d'O₂ est effectuée par des mécanismes non-modulés, tels la photorespiration et la respiration. L'apport de chacun de ces mécanismes pourrait probablement être étudié grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques.

Cette dépendance du signal PA d'O₂ à des contributions non-modulées doit nous rendre très prudents quant à l'utilisation de ce paramètre comme seul indicateur de l'activité photosynthétique. C'est pourquoi, dans la seconde partie de ce chapitre, une attention marquée est portée à l'emmagasiner d'énergie photosynthétique. Nous espérons ultimement pouvoir nous servir de ce paramètre afin de quantifier l'activité photosynthétique de chacun des deux photosystèmes (chapitre 5).

4.2 L'infiltration d'eau et le signal photoacoustique

Le second paramètre utilisé en SPA afin de déterminer l'activité photosynthétique correspond à l'emmagasinement d'énergie photosynthétique (EEP). L'EEP représente la quantité d'énergie absorbée par l'échantillon qui est emmagasinée dans les différents intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons (Bults *et al.*, 1982). Dans les feuilles, l'EEP doit être mesuré à des fréquences de modulation relativement élevées, afin d'éviter la présence de la contribution d'O₂. Cette valeur est par la suite utilisée dans la détermination du signal d'O₂ (voir équation 16), qui elle, est effectuée à basse fréquence de modulation. Deux difficultés sont rencontrées lors de l'utilisation de cette méthodologie: (i) A haute fréquence de modulation, le rapport signal/bruit est faible, ce qui peut rendre l'évaluation de EEP difficile et; (ii) Selon la théorie développée par Malkin et Cahen (1979), l'EEP s'avère, en principe, dépendant de la fréquence de modulation, ce qui pourrait introduire des distorsions dans l'évaluation du signal PA d'O₂ puisque la détermination de cette donnée est effectuée à une fréquence de modulation différente de celle de l'EEP.

Il demeure toujours possible d'éviter ces difficultés en utilisant une autre méthodologie photothermique, et d'extrapoler les valeurs d'EEP obtenues par ces techniques aux mesures PA. C'est le cas par exemple de la radiométrie photothermique (Bults *et al.*, 1982 b, Malkin *et al.*, 1990) et de la spectroscopie par effet mirage (Havaux *et al.*, 1989). Malheureusement, avec ces méthodologies, les conditions de mesure de l'activité photosynthétique diffèrent de celles utilisées en SPA, ce qui peut induire certaines variations non-souhaitables dans l'évaluation du signal PA d'O₂.

Afin de pouvoir étudier l'EEP, et sa variation dans certaines conditions expérimentales, sous des conditions propices (sans la contribution d'O₂ mais à basses fréquences de modulation), nous avons choisi d'infiltrer les feuilles d'eau. Dans ces conditions, la contribution d'O₂ est éliminée, à cause du long chemin que doit emprunter l'O₂ pour diffuser jusqu'à la surface de la feuille (Bults *et al.*, 1982 a). Nous avons ainsi pu étudier l'EEP à faible fréquence de modulation, et ses variations lors de l'induction photosynthétique et lors du passage d'une haute à une faible intensité lumineuse. Nous avons aussi poussé une pointe d'exploration du côté de l'effet de l'infiltration sur les propriétés optiques et photosynthétiques de la feuille. Le but ultime de cette section est de développer une méthodologie nous permettant d'évaluer l'activité photosynthétique de chacun des deux photosystèmes (chapitre 5).

4.2.1 Les mesures d'emmagasinement d'énergie photosynthétique

Les signaux PA d'une feuille dans l'air à 25 Hz changent drastiquement suite à l'infiltration d'eau (figure 22). Dans cette figure, les parties A et B présentent les signaux PA en phase et en quadrature sans aucun ajustement de la phase, alors que les sections C et D montrent les signaux PA en phase et en quadrature lorsque le signal en phase sous le faisceau saturant a été ajusté à zéro. Dans l'air, la variation, autant en amplitude qu'en orientation, des deux canaux lors de l'application du faisceau saturant montre bien la présence de deux contributions (Poulet *et al.*, 1983).

La contribution d'O₂ disparaît complètement suite à l'infiltration d'eau (la composante en phase vaut zéro (figure 22-D)), ce qui permet l'émergence de l'EEP. Il est à remarquer ici que les signaux PA dans les deux canaux montrent un effet similaire

lorsque le faisceau saturant est appliqué. Ce phénomène a été observé à différentes fréquences de modulation, peu importe l'ajustement de phase. Ceci indique que seule l'amplitude du signal PA est changée, pas son orientation. Ainsi, il n'y a qu'une contribution au signal PA dans ces conditions: la contribution photothermique.

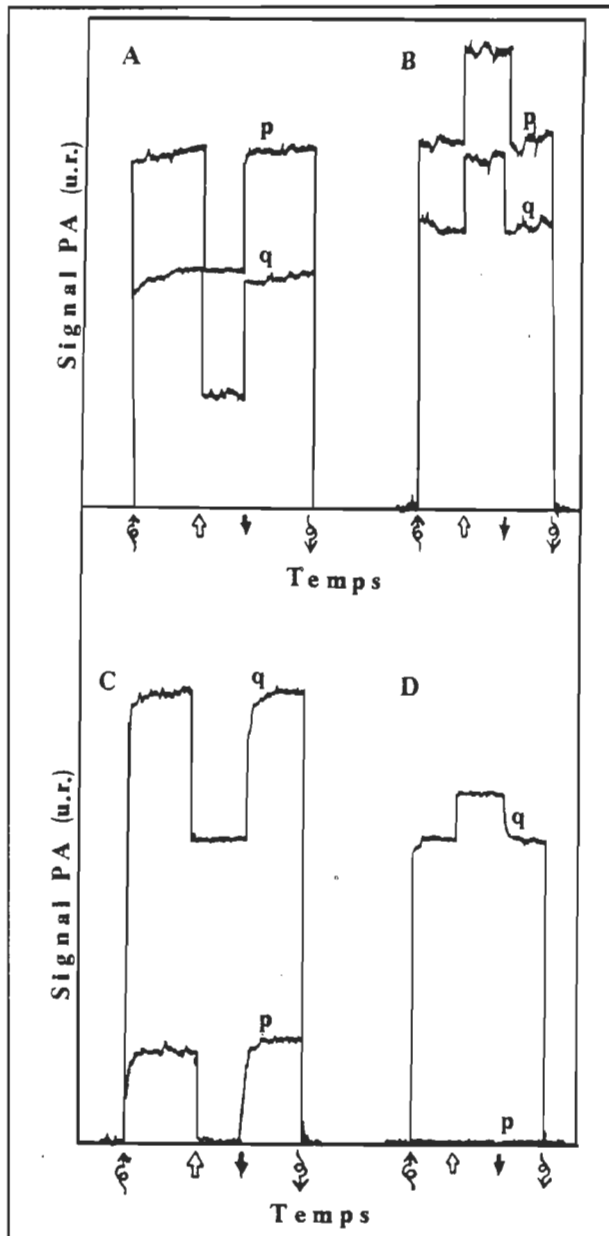


Figure 22: Effet de l'infiltration d'eau sur le signal PA de feuilles de pois. Signal PA sans ajustement de phase avant (A) et après (B) l'infiltration. Signal PA avec ajustement de phase avant (C) et après (D) l'infiltration. p représente la composante en phase alors que q représente la composante en quadrature du signal PA. Les flèches ondulées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (680 nm, $12,7 \text{ W m}^{-2}$, 25 Hz). Les flèches épaisses pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc (450 W m^{-2}).

Avec ce résultat, qui a été vérifié à de nombreuses reprises, nous avons choisi de ne conserver que le signal total en provenance de l'amplificateur à verrouillage de phase, afin d'obtenir un signal maximal. Néanmoins, nous avons veillé à nous assurer de l'absence d'O₂ dans le signal PA avant chaque mesure.

Avant d'aller plus loin, l'effet de l'infiltration d'eau sur l'activité photosynthétique a été évalué. L'EEP de feuilles d'érable à sucre a été déterminé à 80 Hz, avant et après l'infiltration d'eau. A cette fréquence de modulation, la contribution d'O₂ se révèle négligeable dans les feuilles d'érable dans l'air (Charland, 1989). L'EEP s'avère stable au cours du traitement (Tableau II). Néanmoins, il est à noter que pour de très jeunes feuilles, plus de 50 % de l'activité peut s'avérer perdue lors d'un tel traitement. Il ne faut pas oublier que le traitement menant à l'infiltration est dur pour la feuille (certaines feuilles ont littéralement explosé en cours de route (quand ce n'était pas la seringue elle-même!)), ce qui peut causer des bris cellulaires plus important chez les jeunes feuilles, plus fragiles.

Nous nous sommes assurés que l'effet du faisceau saturant sur le signal PA était effectivement relié à la suppression d'une activité photosynthétique en infiltrant les feuilles avec une solution de DCMU. Cet inhibeur du transport d'électrons au niveau de Q_B (Trebst, 1980), stoppe ainsi l'activité photosynthétique du PS II. Suite à l'infiltration de feuilles par une solution de DCMU, à peu près tout l'EEP disparaît, en comparaison avec les feuilles infiltrées d'eau (Tableau III). L'activité résiduelle, bien que minime, peut être reliée à l'activité de transport cyclique d'électrons autour du PS I (Herbert *et al.*, 1990). Ce genre de manipulations montre un potentiel certain de la technique d'infiltration pour étudier l'effet de modulateurs de l'activité photosynthétique *in vivo*.

Tableau II
Effet de l'infiltration d'eau sur l'activité photosynthétique
(EEP)* de feuilles d'érable à sucre

Emmagasinage d'énergie photosynthétique (%)	
Avant infiltration	Après infiltration
$32,2 \pm 5,4$ **	$31,5 \pm 4,3$

*: telle que déterminée à λ : 650 nm; f_{mod} : 80 Hz; I_{mod} : 9 W m^{-2} ;
 I_{sat} : 250 W m^{-2} .

**: Moyenne de 8 échantillons \pm écart-type.

Tableau III
Effet de l'infiltration d'une solution de DCMU*
sur l'EEP** de feuilles de pois

Emmagasinage d'énergie photosynthétique (%)	
Infiltration d'eau	Infiltration de DCMU
$19,2 \pm 2,9$ ***	$0,8 \pm 0,6$

*: Solution de 50 μM de DCMU.

**: tel que déterminé à λ : 640 nm; f_{mod} : 25 Hz; I_{mod} : 9 W m^{-2} ;
 I_{sat} : 250 W m^{-2} .

***: Moyenne de 6 échantillons \pm écart-type.

Au début de nos mesures, nous appréhendions un effet de la composition de la solution d'infiltration sur l'EEP. A cette fin, nous avons comparé l'effet d'une solution iso-osmotique (0,2 M sorbitol + 2 mM MgCl_2 + 10 mM NaCl + 30 mM NaCO_3 dans un tampon 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ à pH 6,8) à de l'eau comme solution d'infiltration. La valeur d'EEP demeure similaire à 680 nm, peu importe le milieu d'infiltration. Par contre, une certaine instabilité de la valeur d'EEP à 710 nm est observée lorsque les feuilles sont infiltrées avec de l'eau pure. Des mesures de vieillissement¹⁰ montrent une diminution parallèle de l'EEP chez des feuilles infiltrées avec l'un ou l'autre des milieux. Donc, puisque la composition de la solution n'affecte généralement pas les mesures d'EEP, l'eau a été choisie comme milieu d'infiltration pour les travaux subséquents.

Une des questions sous-tendant notre étude visait à connaître si la valeur de l'EEP variait selon la fréquence de modulation. Chez les feuilles de pois infiltrées, l'EEP demeure stable entre 10 et 200 Hz (figure 23). Cette constance est aussi observée chez les feuilles de semis d'érable, bien qu'une légère tendance à la hausse puisse être notée au-delà de 200 Hz (figure 23). Si l'on se réfère au modèle théorique développé par Malkin et Cahen (1979), ceci veut dire qu'à l'intérieur d'un domaine de temps compris entre 0,8 ms et 15 ms suivant l'acte photochimique¹¹, il n'y a aucune dissipation d'énergie (enthalpie) significative.

¹⁰ Mesures effectuées sur des feuilles infiltrées laissées pendant un certain laps de temps dans la solution d'infiltration avant la prise d'une mesure PA.

¹¹ Ces valeurs de temps (τ) sont calculées à partir de la fréquence de modulation (f_{mod}) via $\tau = 1/(2.\pi.f_{\text{mod}})$

Dans ce domaine de temps, l'EEP d'une feuille de pois représente environ 30 % de l'énergie des photons rouges. Ceci correspond à peu près à 13 kcal/Einstein. Comme la fixation d'une mole de CO_2 requiert environ 10 Einsteins (Radmer et Kok, 1977), 130 kcal d'énergie sont donc consommées lors de cette réaction. A des fins de comparaison, la valeur calorifique d'une mole de CO_2 dans le glucose est à peu près de 120 kcal. Ainsi, seule une petite fraction de l'énergie ayant servi à la fixation du CO_2 est dissipée, dans un ordre de temps supérieur à 15 ms. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue que la grande majorité de l'énergie absorbée est dissipée dans la première ms, compte tenu des mesures effectuées par Nitsch *et al.* (1988) sur des particules de PS I et de PS II dans le domaine de la μs .

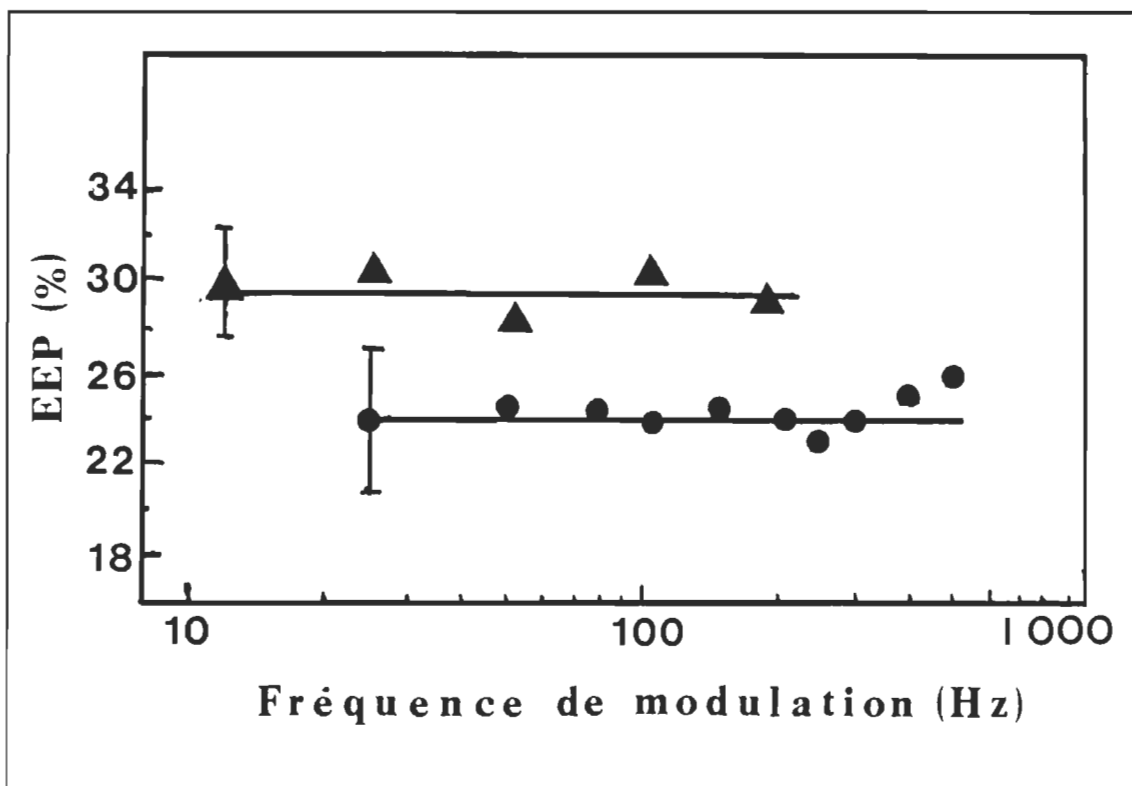


Figure 23: Effet de la fréquence de modulation sur la mesure de l'EEP de feuilles de pois (▲) et d'érable à sucre (●) infiltrées. Faisceau modulé: 650 nm, 7 W m⁻². Autres conditions similaires à celles de la figure 22.

Des conclusions similaires dans le domaine du temps peuvent s'appliquer aux mesures photothermiques effectuées dans le passé en radiométrie (Kanstad *et al.*, 1983) ou en spectroscopie par déflexion (effet mirage, Havaux *et al.*, 1989). Ainsi, la méthodologie PA, suite à l'infiltration d'eau du spécimen, donne des résultats comparables aux autres méthodologies photothermiques.

4.2.2 Les cinétiques thermiques et d'EEP

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux transitions se produisant dans l'EEP. Deux grandes catégories de cinétiques du signal photothermique de feuilles infiltrées ont été étudiées, à partir desquelles des variations de l'EEP peuvent être déduites: (i) les transitions reliées à l'induction photosynthétique se produisant lors du passage d'une période d'adaptation à l'obscurité à une illumination; et (ii) les transitions lors du passage d'une haute intensité lumineuse (faisceaux modulé et saturant) à une faible intensité lumineuse (faisceau modulé seulement).

Les transitions reliées à l'induction de l'activité photosynthétique ne se produisent qu'après une période d'adaptation à l'obscurité relativement longue (plus de 30 min). Lorsque l'illumination modulée est rapidement restaurée, une hausse rapide du signal photothermique se produit jusqu'à un niveau maximal, ce qui correspond au même moment à une valeur d'EEP minimale (figure 24). Par la suite, le signal photothermique décroît lentement, jusqu'à atteindre un état stationnaire où l'EEP est optimal.

Il est connu que la première phase de l'induction photosynthétique -la phase de montée rapide- correspond à une fermeture complète (et par le fait même, à une

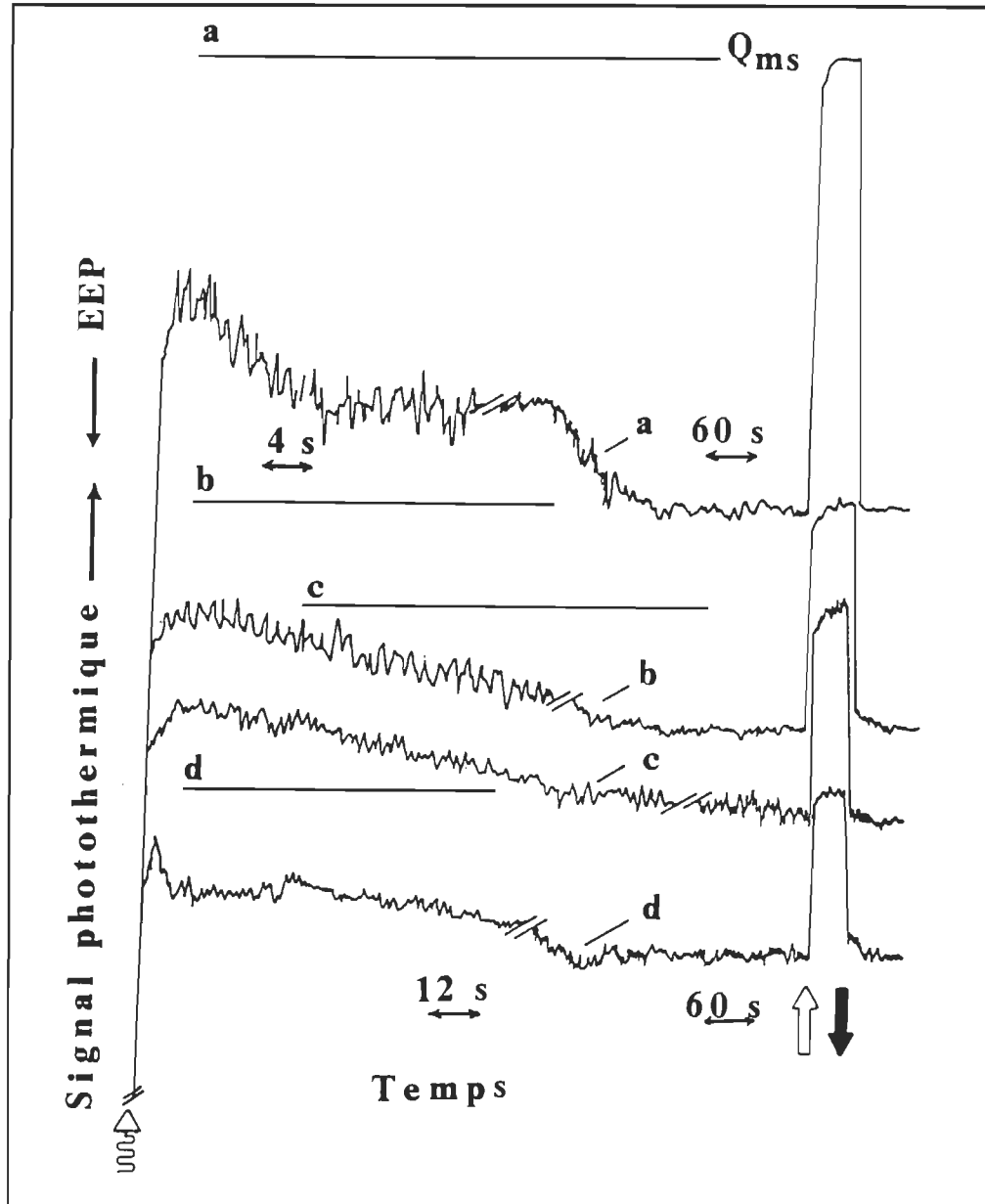


Figure 24: Effet du temps d'adaptation à l'obscurité sur les cinétiques thermiques (et leur inverse, d'EEP) de feuilles de pois. A- 1 h, B- 0,5 h, C- 1 h, D- 2 h. Sur ces tracés, la ligne de base est placée en-deça du zéro habituel suite à la suppression de ce dernier sur l'amplificateur, et la sensibilité est étendue (note: elle n'est pas la même pour tous les tracés). Les barres horizontales montrent le niveau du signal PA en présence du faisceau saturant blanc, une référence pour déterminer l'EEP. Conditions et symboles similaires à ceux de la figure 22. Note: L'échelle de temps n'est pas la même pour toutes les courbes.

incompétence photochimique) du PS II, tel que révélé par l'augmentation rapide de la fluorescence (Schreiber, 1986). Les résultats présentés ici montrent qu'une certaine contribution d'EEP persiste lorsque le signal photothermique est maximal.

Cet EEP résiduel serait probablement dû à la contribution du PS I, *via* le transport cyclique autour du PS I ou à un transport d'électrons en provenance de composés endogènes excluant le PS II. Une telle situation, où le PS I est actif malgré l'impossibilité pour le PS II de donner des électrons, a déjà été observée chez des chloroplastes brisés en l'absence d'accepteurs d'électrons (Lasser-Ross *et al.*, 1980).

A des fins de comparaison, nous avons aussi suivi les cinétiques d'oxygène des feuilles avant de les infiltrer (figure 25). La baisse du signal photothermique (donc la hausse d'EEP) correspond avec la hausse du signal d'O₂, ce qui nous renseigne sur la nature photochimique de ce comportement.

Afin de mieux caractériser la valeur initiale de l'EEP (lorsque le signal photothermique est maximal), une étude de quelques paramètres PA a été entreprise. En comparant la valeur de l'EEP initial à celle de l'EEP à l'état stationnaire, nous pouvons conclure que 30 min d'adaptation sont suffisantes afin d'obtenir un EEP initial minimal (figure 26-A). Cette durée est néanmoins supérieure à celle utilisée lors des mesures de fluorescence (10 à 15 min; Schreiber, 1986). Dans un deuxième temps, les expériences effectuées en faisant varier l'intensité du faisceau modulé montrent une dépendance de l'EEP initial en relation avec ce paramètre (figure 26-B). Une augmentation de l'intensité du faisceau modulé induit une diminution de l'EEP initial (par rapport à l'EEP à l'état stationnaire). Ceci s'explique par la saturation partielle de l'activité

photosynthétique modulée par le faisceau modulé, phénomène similaire à celui observé en fluorescence.

Ceci démontre qu'il est possible pour le PS II de présenter une activité photochimique dès les premiers instants d'induction, mais qu'elle n'est possible qu'à faible intensité lumineuse. Cette photoactivité doit cependant posséder une étape limitante à

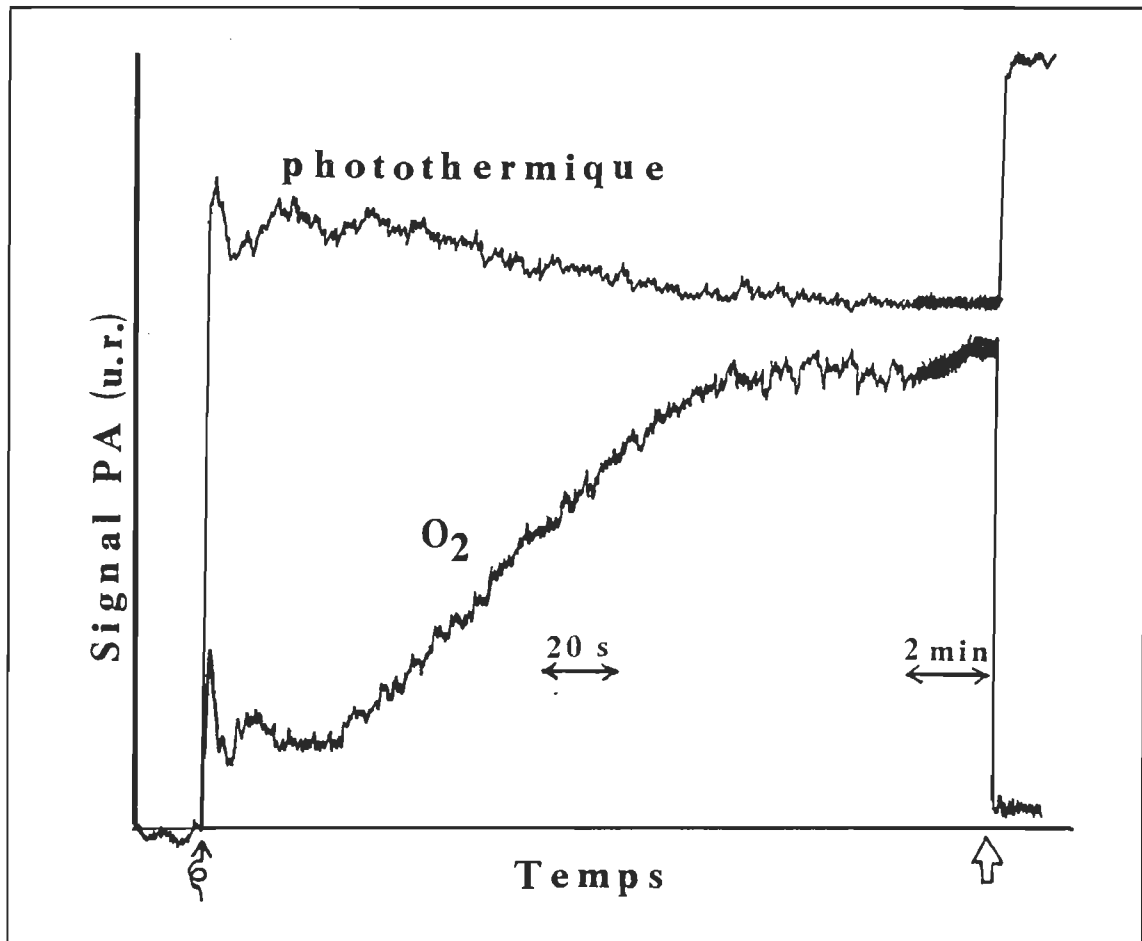


Figure 25: Comparaison entre les cinétiques thermique (tracé du haut) et d'oxygène (tracé du bas) de la même feuille de pois lors d'une transition obscurité-éclairage (préadaptée pendant 30 min à l'obscurité). La cinétique d'O₂ (composante en phase du signal PA) a été enregistrée avant l'infiltration. Conditions et symboles similaires à ceux de la figure 22.

l'obscurité présentant un taux très faible. Cette étape pourrait s'apparenter à un faible transfert d'électrons vers le PS I ou vers un accepteur d'électrons endogène (O_2 ?), ou à un transport cyclique d'électrons autour du PS II. La valeur maximale de l'EEP initial (à 25 Hz et 650 nm) est d'environ 60 % de la valeur d'EEP à l'état stationnaire. Néanmoins, la valeur de l'EEP initial ne semble pas dépendante de la fréquence de modulation (Tableau IV).

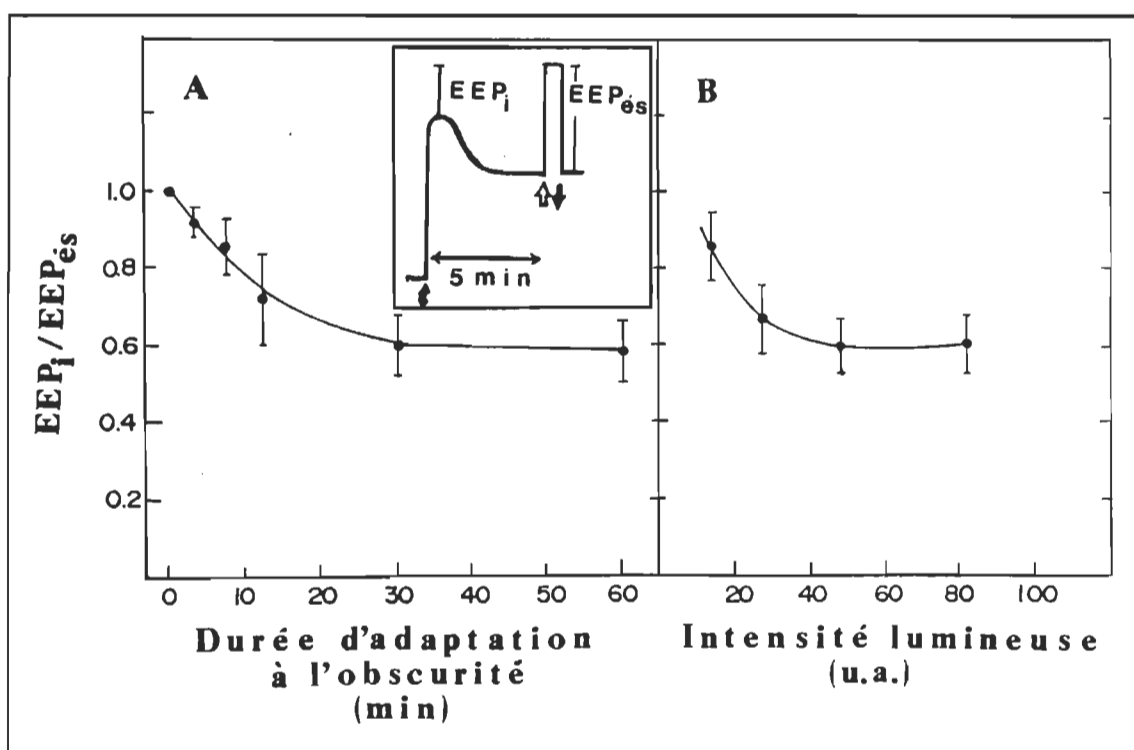


Figure 26: Insert: Schéma d'une cinétique thermique, suite à la transition obscurité-illumination, présentant les paramètres utilisés dans la figure principale. Symboles similaires à ceux de la figure 22.

A- Effet du temps de préadaptation à l'obscurité sur le rapport EEP_i/EEP_{es} . Faisceau modulé: 650 nm, 25 Hz, 7 W m^{-2} . Autres conditions similaires à celles de la figure 22.

B- Effet de l'intensité du faisceau modulé sur le rapport EEP_i/EEP_{es} . Faisceau modulé: 650 nm, 25 Hz. Autres conditions similaires à celles de la figure 22.

Tableau IV

Rapports de l'EEP initial/EEP état stationnaire*
mesurés à différentes fréquences de modulation

Frequence de modulation (Hz)	EEP initial / EEP stationnaire (%)
13	$58 \pm 18^{**}$
25	58 ± 12
50	57 ± 22
100	52 ± 15

*: Mesures effectuées après 30 min d'adaptation à l'obscurité, à λ : 650 nm;

I_{mod} : 7 W m⁻²; I_{sat} : 250 W m⁻².

**: Moyenne de 6 échantillons \pm écart-type.

De façon plus particulière, nous nous sommes attardés à tenter de mieux résoudre la cinétique thermique. Quelques particularités de cette cinétique sont à noter, bien qu'elles ne se retrouvent pas toujours présentes. Une des grandes causes de cette absence provient de l'augmentation du bruit lorsque le temps de résolution de l'appareil est diminué (i.e. 100 - 400 ms). Ce bruit mécanique, qui est transmis à la cellule PA, s'avère variable dans le temps.

En suivant la cinétique d'induction, nous devrions observer au tout début une valeur relativement élevée de l'EEP, qui diminuerait rapidement vers une valeur minimale (donc un signal photothermique maximal). Cette phase très rapide correspond au transfert très bref d'électrons du PS II vers le bassin de PQ, une réaction qui se reflète dans l'augmentation rapide de fluorescence (Malkin et Kok, 1966) et dans un pulse d'O₂ initial (Joliot, 1963, Malkin, 1987, voir aussi la figure 25). Cette augmentation rapide du signal photothermique peut incidemment être observée dans les figures 24-B et C.

D'autres caractéristiques peuvent aussi être signalées. Dans plusieurs cas, la première phase de l'augmentation d'EEP, suivant la diminution initiale, consiste en une relaxation à un plateau intermédiaire, puis à la diminution finale vers l'état stationnaire (ce qui est très visible dans la figure 24-A et D). A quelques reprises, nous avons aussi remarqué un ou deux cycles d'augmentation-diminution de l'EEP avant d'atteindre un état stationnaire (figure 25). La comparaison avec la cinétique de dégagement d'O₂ montre que le dernier cycle s'avère probablement relié à l'augmentation lente du dégagement d'O₂ (figure 25). La correspondance exacte entre les caractéristiques de la cinétique thermique et celles de fluorescence et d'oxygène resterait cependant à être encore mieux étudiée.

La deuxième catégorie de transitions du signal photothermique à avoir été étudiée concerne celle se produisant lors de l'extinction du faisceau saturant. Lorsque le faisceau saturant est allumé, le signal photothermique atteint immédiatement une valeur maximale. Mais, lors de l'extinction du faisceau saturant, le signal photothermique diminue en deux temps. Une baisse très rapide est observée en premier lieu, suivie par

un retour plus lent à un état stationnaire (figure 27). Ainsi, l'EEP n'est pas immédiatement totalement restauré, ce qui s'apparente à la cinétique de dégagement d' O_2 mesurée concurremment (figure 27). Les deux transitions se révèlent similaires, probablement à cause du faible rendement photosynthétique lié à l'adaptation aux hautes intensités lumineuses (Weis et Berry, 1987). Ainsi, suite à l'extinction du faisceau saturant, le dégagement d' O_2 et l'EEP se révèlent inférieurs à leur valeur à l'état stationnaire.

L'importance relative de chacune des deux phases de l'augmentation d'EEP varie légèrement d'un échantillon à l'autre. De façon générale, la phase lente représente 25 % de l'EEP total, alors qu'elle constitue jusqu'à 50 % de la montée du signal d' O_2 (ce qui

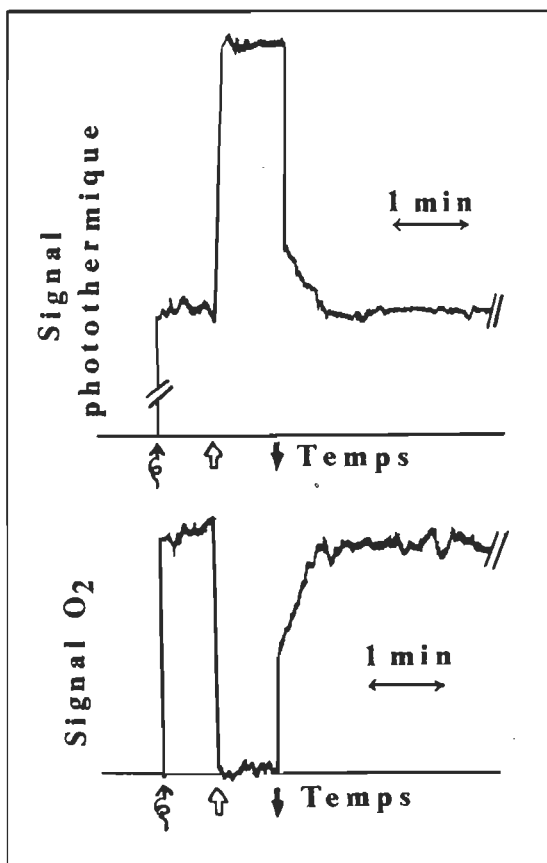


Figure 27: Cinétiques thermiques (tracé du haut) et d'oxygène (tracé du bas) de la même feuille de pois lors de l'extinction du faisceau saturant blanc. La cinétique d' O_2 a été enregistrée avant l'infiltration. Conditions similaires à celles de la figure 25, symboles similaires à ceux de la figure 22.

indique un rendement quantique initial du PS II de moitié de son rendement maximal). Ces valeurs sont du même ordre que des estimations antérieures à l'effet que l'EEP est composé d'égales contributions du PS I et du PS II, et que la contribution du PS I est constante (Malkin *et al.*, 1990, Fork *et al.*, 1991 et Malkin *et al.*, 1991). Il faut toutefois noter que cette dernière hypothèse dépend jusqu'à un certain point de la distribution d'énergie entre les deux PS (ce que nous verrons dans le chapitre 5) et du degré d'ouverture des centres réactionnels. Afin d'assurer un transport maximal d'électrons à l'état stationnaire, l'activité des deux PS doit être balancée. Autrement, une baisse de l'activité du PS I devrait suivre une diminution de l'activité du PS II lors de l'extinction du faisceau saturant, bien que le PS I puisse probablement être engagé dans une activité indépendante (transport cyclique).

En résumé, j'ai démontré au cours des dernières pages que l'infiltration de feuilles constituait une méthodologie souhaitable afin d'étudier l'EEP à basse fréquence de modulation. Il serait possible de suivre grâce à cette technique l'effet de modulateurs de l'activité photosynthétique *in vivo*. L'étude des cinétiques thermiques -et de leur contrepartie, les cinétiques d'EEP- est aussi permise *via* l'infiltration. Le potentiel de la méthodologie se révèle fort prometteur.

Il nous apparaît fort probable que l'infiltration d'eau puisse affecter certains mécanismes physiologiques -l'ouverture des stomates par exemple-, ce qui ultimement pourrait induire une variation de l'activité photosynthétique. Comme il a été démontré par Bulst *et al.* (1982) que le degré d'ouverture des stomates n'influencait pas les mesures photoacoustiques, nous ne croyons pas que cette contrainte puisse affecter nos mesures de l'activité photosynthétique chez des feuilles infiltrées.

4.2.3 Les propriétés optiques d'une feuille infiltrée

Les feuilles présentent quelques caractéristiques morphologiques (espaces aérifères, cuticule) qui visent à maximiser l'absorption lumineuse en augmentant la réflexion interne et la diffusion de la lumière incidente (Vogelmann et Björn, 1986). Pour cette raison, il se révèle difficile, sinon impossible, de déterminer le spectre d'absorption réel d'une feuille. En fait, le spectre est généralement plat, les détails spectraux des bandes d'absorption sont perdus, ce qui empêche une analyse spectrale exhaustive des pigments présents.

Les spectres PA de feuilles obtenus jusqu'à maintenant présentent les mêmes caractéristiques (ou la même absence de données spectrales bien résolues) que les spectres d'absorption (Buschmann et Prehn, 1981, Veeranjanyulu et Das, 1982, 1985, O'Hara *et al.*, 1983, Nagel *et al.*, 1987). Il se révèle possible d'avoir une idée générale de la composition pigmentaire, mais sans plus. De plus, plusieurs des spectres souffrent de distorsions importantes, puisque les auteurs, à l'exception de O'Hara *et al.*, ont négligé d'utiliser le faisceau saturant afin d'éliminer les contributions d'O₂ et d'EEP du signal PA. Ces deux contributions, liées à l'activité photosynthétique, sont dépendantes de la longueur d'onde d'analyse, et distordent donc le spectre PA du spectre thermique pur.

Nous avons vérifié l'effet de l'infiltration d'eau sur les caractéristiques spectrales de feuilles de plants de pois (figure 28) et de fraise (figure 29), feuilles qui s'avèrent faciles à infiltrer.

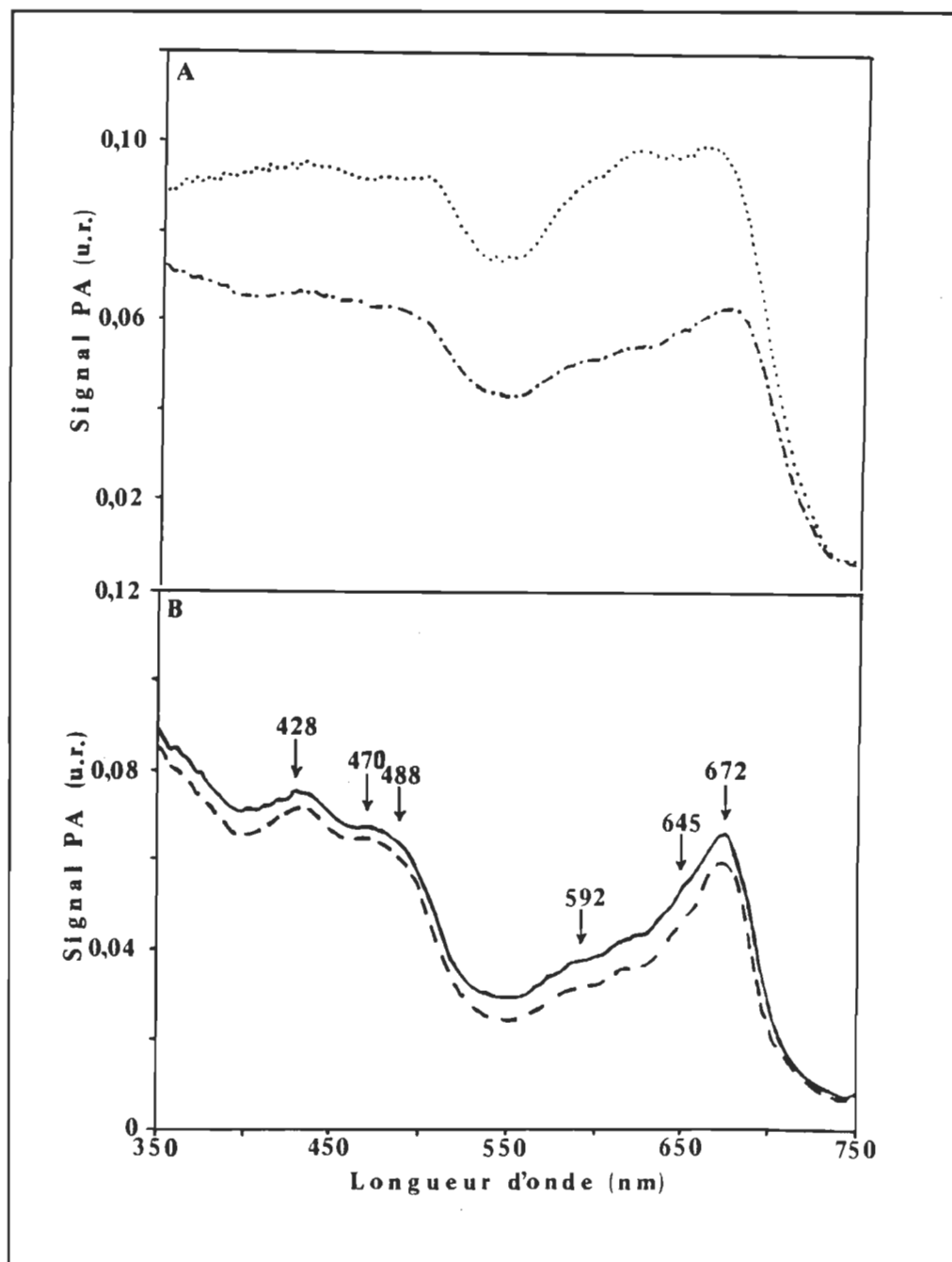


Figure 28: Spectres photoacoustiques de feuilles matures de pois.

A- Spectres PA de feuilles dans l'air avec (-.-) et sans (...) le faisceau saturant blanc.

B- Spectres PA de feuilles infiltrées avec (—) et sans (---) le faisceau saturant blanc.

Faisceau modulé: 20 Hz; Faisceau saturant blanc: 300 W m^{-2} . Les spectres sont une moyenne de 6 échantillons différents. Les mêmes feuilles ont été utilisées pour les quatre spectres.

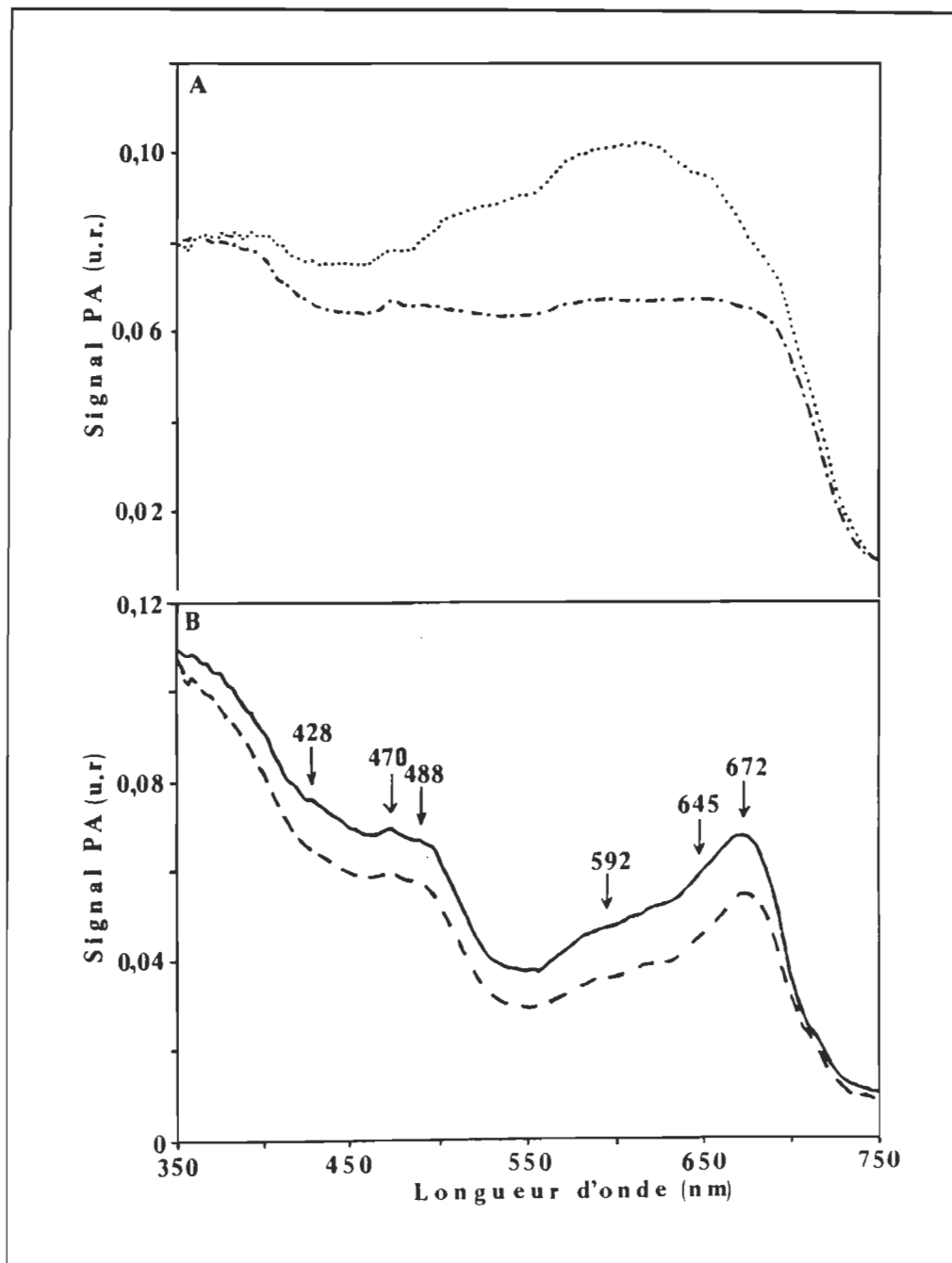


Figure 29: Spectres photoacoustiques de feuilles matures de fraisier.

A- Spectres PA de feuilles dans l'air avec (-.-) et sans (...) le faisceau saturant blanc.

B- Spectres PA de feuilles infiltrées avec (—) et sans (---) le faisceau saturant blanc.

Conditions similaires à celles de la figure 28. Les spectres sont une moyenne de 5 échantillons différents. Les mêmes feuilles ont été utilisées pour les quatre spectres.

L'illumination avec le faisceau saturant induit la fermeture des centres réactionnels, ce qui résulte en l'abolition de l'activité photosynthétique modulée. Les contributions modulées d'O₂ et d'EEP sont réduites à zéro et toute l'énergie absorbée est transformée en chaleur (on assume que la fluorescence est négligeable). Il devient alors possible d'obtenir un spectre d'action thermique, qui s'avère très similaire à un spectre d'absorption.

Les distorsions liées aux contributions d'O₂ et d'EEP au signal PA sont clairement visibles lorsque l'on compare les spectres PA de feuilles dans l'air en présence (tirets), et en absence (pointillés) du faisceau saturant (figures 28 A et 29 A). Des différences marquées entre les deux spectres sont observées au niveau de la forme du spectre et de la position des pics d'"absorption". Ainsi, l'abaissement de l'intensité du pic maximum dans la région rouge du spectre n'est pas relié à une absorption différente, mais est bien dû au fait que le signal PA ne représente pas les mêmes contributions avec et sans le faisceau saturant, contrairement à des interprétations antérieures basées sur des traitements au DCMU (Buschmann et Prehn, 1983). Néanmoins, la forme des spectres PA en présence du faisceau saturant demeure plutôt plate dans les deux types de feuilles. L'attribution de bandes à des pigments demeure ainsi difficile.

Il a déjà été démontré que l'infiltration d'une feuille, en remplissant d'eau les espaces aérifères, modifiait considérablement les propriétés optiques (Moss et Loomis, 1952, Gausman *et al.*, 1974). Lorsque nous nous attardons sur l'aspect spectroscopique de la méthodologie PA, l'infiltration présente deux avantages: (i) Comme nous l'avons déjà vu, l'élimination de la contribution d'O₂ nous permet de travailler à des fréquences de modulation basses, ce qui augmente notre rapport signal/bruit; et (ii) La variation des

propriétés optiques de la feuille augmente sensiblement la résolution spectrale (figures 28 B et 29 B).

Les spectres PA de feuilles infiltrées (courbes pleines) présentent 6 pics distincts, communs aux deux plantes, qui peuvent être attribués à des pigments spécifiques. Deux pics majeurs, situés à 428 et 672 nm, sont reliés à la bande de Soret et à la transition Q_y (0-0) de la chlorophylle a, respectivement. Un petit pic, observable à 590 nm, peut être attribué à un mélange de bandes vibroniques Q_y et Q_x (Fragata, communication personnelle). La chlorophylle b possède deux bandes, localisées à 470 nm et 645 nm (la dernière n'est, toutefois, pas toujours parfaitement discernable). Les larges épaulements présents à 488 et 592 nm peuvent être attribués aux caroténoïdes (Goedheer, 1966). Pour tous les échantillons étudiés, le signal PA minimal se situe entre 548 et 554 nm.

Tous ces pics sont près, sinon similaires à ceux déterminés en spectroscopie photothermique de déflexion (effet mirage, Havaux *et al.*, 1989, Lorrain *et al.*, 1990). La méthodologie PA possède cependant l'avantage de permettre l'enregistrement de spectres de feuilles pubescentes (fraise), ce qui n'est pas possible avec l'effet mirage puisque le faisceau sonde doit être situé très près de l'échantillon.

La meilleure résolution spectrale obtenue en infiltrant les feuilles, est probablement due à la variation des propriétés optiques de celles-ci. L'eau, en remplissant les espaces aérifères, prévient les réflexions multiples internes (produites à l'interface entre les espaces aérifères et les cellules), puisque dans ces conditions, le milieu interne de la feuille possède un indice de réfraction plutôt uniforme (celui de l'eau, $n = 1,5$; Gausman *et al.*, 1974).

Cette donnée, au demeurant un avantage pour des mesures spectroscopiques, peut toutefois s'avérer un handicap lorsque vient le temps de s'intéresser à des mesures physiologiques (ce dont traitera le prochain chapitre). En effet, une variation des propriétés optiques de la feuille devrait affecter la longueur d'absorption optique, ce qui amènerait une variation de la couche sondée par la méthodologie photoacoustique. Bien que des mesures supplémentaires pourraient certes être requises, nous ne croyons pas que cette augmentation de la longueur d'absorption optique puisse aller jusqu'à englober des assises cellulaires de la face inférieure de la feuille.

Le signal PA des feuilles infiltrées en absence du faisceau saturant (courbes tiret-pointillé) se révèle toujours inférieur à celui observé en présence du faisceau saturant (courbes pleines). Cette baisse est liée à l'EEP, la portion de l'énergie absorbée qui est emmagasinée dans les divers intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons.

En conclusion, l'infiltration d'eau permet d'augmenter la résolution spectrale de la méthodologie PA, puisqu'elle élimine certaines réflexions internes de la lumière. L'utilisation de la méthodologie photoacoustique permet toutefois l'étude des feuilles pubescentes ou légèrement incurvées, ce qui s'avère un avantage sur la méthodologie de l'effet mirage.

CHAPITRE 5

MESURE DE L'ACTIVITÉ DES PHOTOSYSTÈMES I ET II

Un des objectifs majeurs de ce projet de recherche consistait à développer une méthodologie photoacoustique qui permettrait la mesure de l'activité de chacun des deux photosystèmes. Je présente donc dans ce chapitre la méthodologie que nous avons développée, ainsi que les recherches que nous avons entreprises sur l'activité des PS I et PS II lors des transitions d'état et dans le spectre visible. Cette méthodologie sera par la suite utilisée afin de déterminer l'effet d'un stress photoinhibiteur sur chacun des deux photosystèmes (chapitre 6).

5.1 La mesure de $EEP_{PS I}$ et $EEP_{PS II}$

Il se révèle possible de déterminer l'activité de transport cyclique d'électrons autour du PS I en SPA. Il a été démontré que l'utilisation d'un faisceau modulé à 700 nm permettait de mesurer cette activité chez les cyanobactéries (Canaani *et al.*, 1989), les algues et les plantes supérieures (Herbert *et al.*, 1990). A cette longueur d'onde, le PS II n'est pas excité, ce qui rend possible la détermination de l'EEP lié au transport cyclique d'électrons. Nous nous sommes donc inspirés de cette méthodologie afin de développer la nôtre, qui permet la détermination simultanée de l'activité photochimique complète des deux photosystèmes.

Le point névralgique de cette méthodologie réside dans l'utilisation de la lumière dans le domaine du rouge lointain. Cette lumière continue sert ici à saturer l'activité du

PS I, peu importe la longueur d'onde du faisceau modulé. Ainsi, la différence entre l'amplitude du signal PA en présence et en absence du faisceau saturant rouge lointain représente l'énergie emmagasinée par le PS I (figure 30).

Notre référence est toujours constituée de l'amplitude du signal PA en présence du faisceau saturant blanc. Comme dans ces conditions, toute activité photochimique des deux photosystèmes se retrouve saturée, l'amplitude du signal PA constitue l'expression de la quantité d'énergie absorbée par tous les pigments de la feuille (Bults *et al.*, 1982).

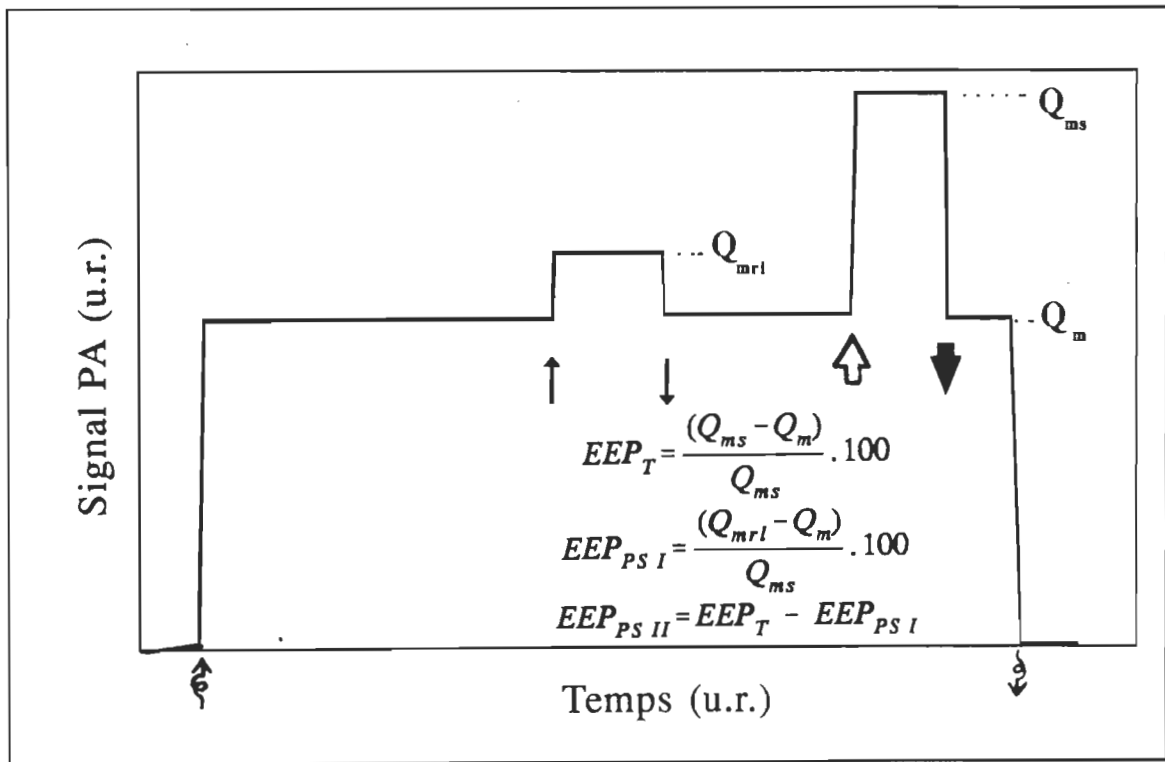


Figure 30: Représentation schématique du signal PA d'une feuille, qui permet la mesure de EEP_T , $EEP_{PS I}$ et $EEP_{PS II}$. Les flèches ondulées pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé. Les flèches épaisses pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc. Les flèches fines pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant rouge lointain.

Ainsi, la différence de l'amplitude du signal PA en présence (Q_{ms}), et en absence (Q_m) du faisceau saturant blanc représente l'énergie absorbée et emmagasinée par les deux photosystèmes. L'EEP total (EEP_T) des deux photosystèmes peut être exprimé par:

$$EEP_T = EEP_{PSI} + EEP_{PSII} = \left(\frac{Q_{ms} - Q_m}{Q_{ms}} \right) \cdot 100 \quad (21)$$

Il devient possible d'exprimer mathématiquement la valeur de l'EEP du PS I (EEP_{PSI}) par la différence du signal PA en présence (Q_{mrl}) et en absence (Q_m) du faisceau saturant rouge lointain, divisée par l'amplitude du signal PA en présence du faisceau saturant blanc:

$$EEP_{PSI} = \left(\frac{Q_{mrl} - Q_m}{Q_{ms}} \right) \cdot 100 \quad (22)$$

A partir de l'équation 1, l'EEP du PS II (EEP_{PSII}) peut être déterminé, puisque

$$EEP_{PSII} = EEP_T - EEP_{PSI} \quad (23)$$

Avant d'aller plus loin, trois précisions méritent d'être apportées.

Comme dans le cas du faisceau saturant blanc (Charland, 1989), il se révèle important de déterminer une intensité du faisceau rouge lointain qui soit saturante. Nous avons donc utilisé le même montage que pour le faisceau saturant blanc, mais en retirant le filtre thermique et en ajoutant une série de filtres (GG427, OG560, RG645 et RG715). Ceci nous permet d'obtenir un faisceau continu de longueurs d'onde supérieures à 700

nm (voir la figure 14, page 85) et d'une intensité suffisante pour saturer l'activité du PS I (figure 31). Ainsi, nous pouvons utiliser une intensité de 150 W m^{-2} pour saturer l'activité du PS I, intensité valide pour plusieurs longueurs d'onde différentes (figure 35, page 144).

Le second point concerne la possibilité pour le faisceau saturant rouge lointain d'exciter le PS II, ce qui aurait pour effet, suite à un éventuel dégagement d' O_2 et à la

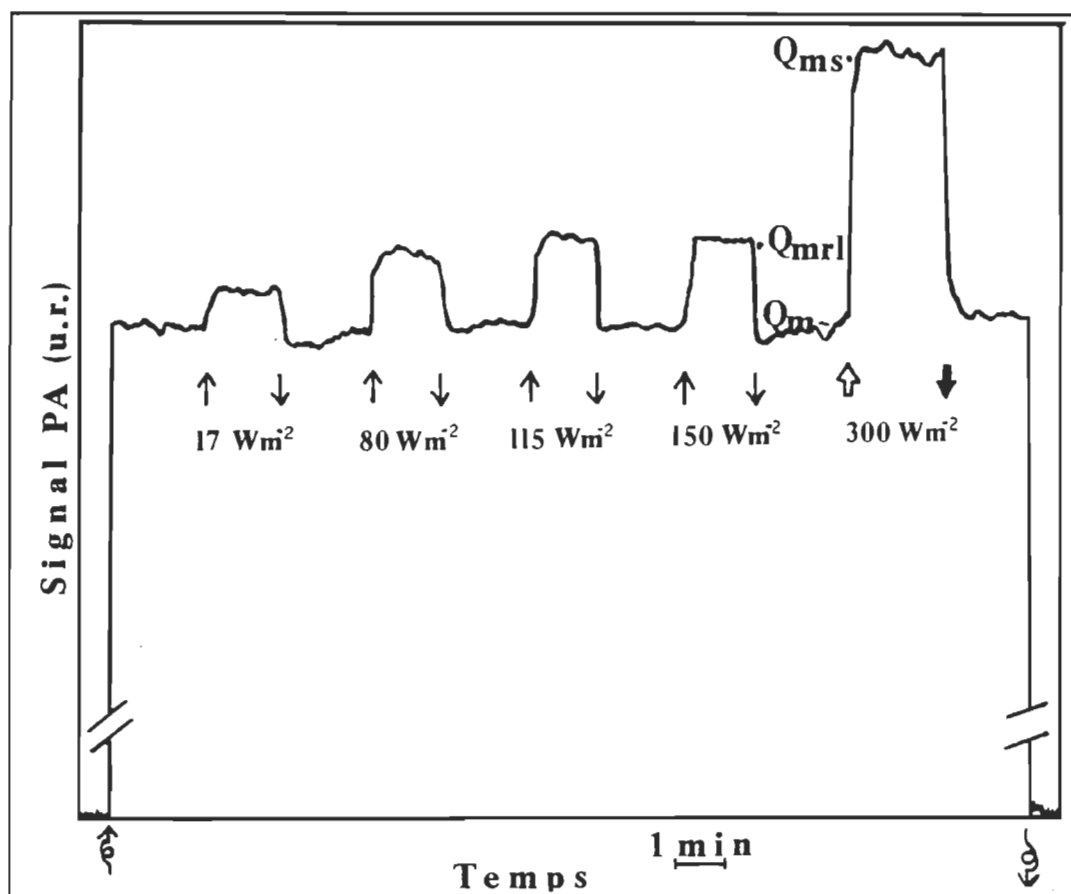


Figure 31: Effet de l'intensité du faisceau saturant rouge lointain sur la mesure d' $\text{EEP}_{\text{PS I}}$ de feuilles d'érable à sucre. Faisceau modulé: 650 nm , 7 W m^{-2} , 80 Hz ; Faisceau saturant blanc: 300 W m^{-2} ; Faisceau saturant rouge lointain: $\lambda > 715 \text{ nm}$.

présence d'EEP du PS II, de fausser nos résultats. Ceci s'avère possible puisque des expériences récentes ont permis d'établir qu'une lumière de 723 nm induisait un dégagement d'O₂, bien que très inférieur à celui observé à 655 nm par ailleurs, chez *Chlorella* (Greenbaum et Mauzerall, 1991). Nous avons donc vérifié cette éventualité en soumettant quelques échantillons à une illumination modulée du faisceau rouge lointain. Sur les 7 échantillons étudiés, un seul a présenté un très léger dégagement d'O₂ (environ 1 % du signal photothermique). Ceci nous permet donc d'affirmer que le faisceau saturant rouge lointain ne présente que des effets négligeables sur l'activité du PS II.

Troisièmement, la signification physique de $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$ se révèle bien importante à comprendre. Le fait de diviser ces données par l'absorption totale de la feuille nous donne une contribution **relative** à l'activité photosynthétique totale de la feuille et non pas une valeur absolue pour chacun des photosystèmes. Malheureusement, il n'est pas encore possible de déterminer l'absorption de chacun des deux photosystèmes en SPA, ce qui nous aurait permis d'exprimer l'activité en termes de rendement quantique de chacun des deux photosystèmes.

A ce sujet, des mesures PA ne nous ont pas permis de corréler la quantité de chlorophylle au signal photothermique (Charlebois, 1992). Deux raisons sont avancées pour expliquer ce manque de corrélation: (i) en SPA, la profondeur sondée ne correspond pas à l'épaisseur totale de l'échantillon, alors que l'on détermine spectrophotométriquement la quantité totales de pigments; et (ii) les molécules de chlorophylle se présentent sous différentes formes (monomère, dimère, oligomère) absorbant à différen-

tes longueurs d'onde, alors qu'en utilisant une lumière monochromatique, nous ne sondons pas toutes ces formes aussi efficacement les unes que les autres.

5.2 Activité des PS I et PS II lors des transitions d'état

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les transitions d'état visent à maximiser l'activité photosynthétique en permettant une distribution balancée de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Biggins et Bruce, 1989, Fork et Satoh, 1986). Les mesures de dégagement d'O₂ en SPA ont été avantageusement utilisées dans l'étude des transitions d'état (Canaani et Malkin, 1984 a et b, Canaani *et al.*, 1984), et ont permis de corroborer les observations fluorimétriques antérieures sur la redistribution d'énergie entre les deux photosystèmes. Néanmoins, les deux types d'études indiquent que le surplus d'excitation reçu par le PS I en état 2 se révèle inférieur à la baisse d'excitation du PS II; il semble y avoir donc perte de l'énergie d'excitation (Canaani et Malkin, 1984 a, Malkin *et al.*, 1986). De plus, la quantité d'informations sur les états de transition chez les plantes supérieures, *in vivo*, se révèle limitée. Nous avons donc étudié les différents EEP durant les transitions d'état chez des feuilles d'érable à sucre.

Ces travaux ont été effectués à une fréquence de modulation de 80 Hz, où l'EEP_T se révèle similaire à celui obtenu à 500 Hz (Charland, 1989, et chapitre 4). Dans ces conditions, le rapport signal/bruit devient favorable à des mesures précises. L'intensité du faisceau modulé, 7 W m⁻², se situe dans un domaine limitant la photosynthèse. L'état 1 est induit dans l'échantillon suite à son illumination pendant 25 min avec les faisceaux, modulé à 650 nm et continu dans le rouge lointain (même arrangement de filtres

que pour le faisceau saturant rouge lointain, mais d'intensité environ 10 fois moindre); alors que l'état 2 est créé suite à l'illumination pendant 25 min avec le faisceau modulé à 650 nm seulement.

Les données présentées à la figure 32 proviennent d'un échantillon typique, suite à l'induction de l'état 1 ou 2. Dans ce cas, l' EEP_T a diminué de 0,9 % lors de la transition de l'état 1 vers l'état 2 mais, de façon générale, l' EEP_T demeure constant lors des transitions d'état (Tableau V). Ceci nous montre qu'il ne semble pas y avoir de perte d'excitation totale lors des transitions d'état, contrairement aux mesures antérieures de fluorescence ou de dégagement d' O_2 (Canaani et Malkin, 1984 à, Malkin *et al.*, 1986).

La valeur de l' $EEP_{PS\ I}$ augmente lors de la transition vers l'état 2, ce qui indique clairement une variation de la section efficace du PS I. Cette donnée peut être corrélée avec l'augmentation de la fluorescence du PS I dans l'état 2 (Fork et Satoh, 1986). Inversement, l' $EEP_{PS\ II}$ diminue, d'une valeur égale à l'augmentation de l' $EEP_{PS\ I}$ lors de la transition vers l'état 2. Les fractions d'énergie échangées entre les photosystèmes représentent environ 5 % de l'énergie lumineuse absorbée, 19 % de l' EEP_T , 34 % de l' $EEP_{PS\ II}$ et 43 % de l' $EEP_{PS\ I}$ dans l'état 2.

Ainsi, les variations de l' EEP des PS I et PS II observées lors des transitions d'état supportent clairement le modèle des changements de sections efficaces des PS pendant les transitions d'état. Le gain d'énergie du PS I réalisé lors de la transition de l'état 1 vers l'état 2 provient du PS II (qui en perd), probablement *via* la migration du CCL II mobile. En considérant que la lumière 1 (rouge lointain) est exclusivement

absorbée par le PS I, l'illumination par le faisceau saturant rouge lointain ne libère que l'énergie absorbée par le PS I. Lorsque le CCL II est associé au PS I - dans l'état 2- (voir figure 6, page 30) l' $EEP_{PS I}$ se doit d'être supérieur à celui observé dans l'état 1.

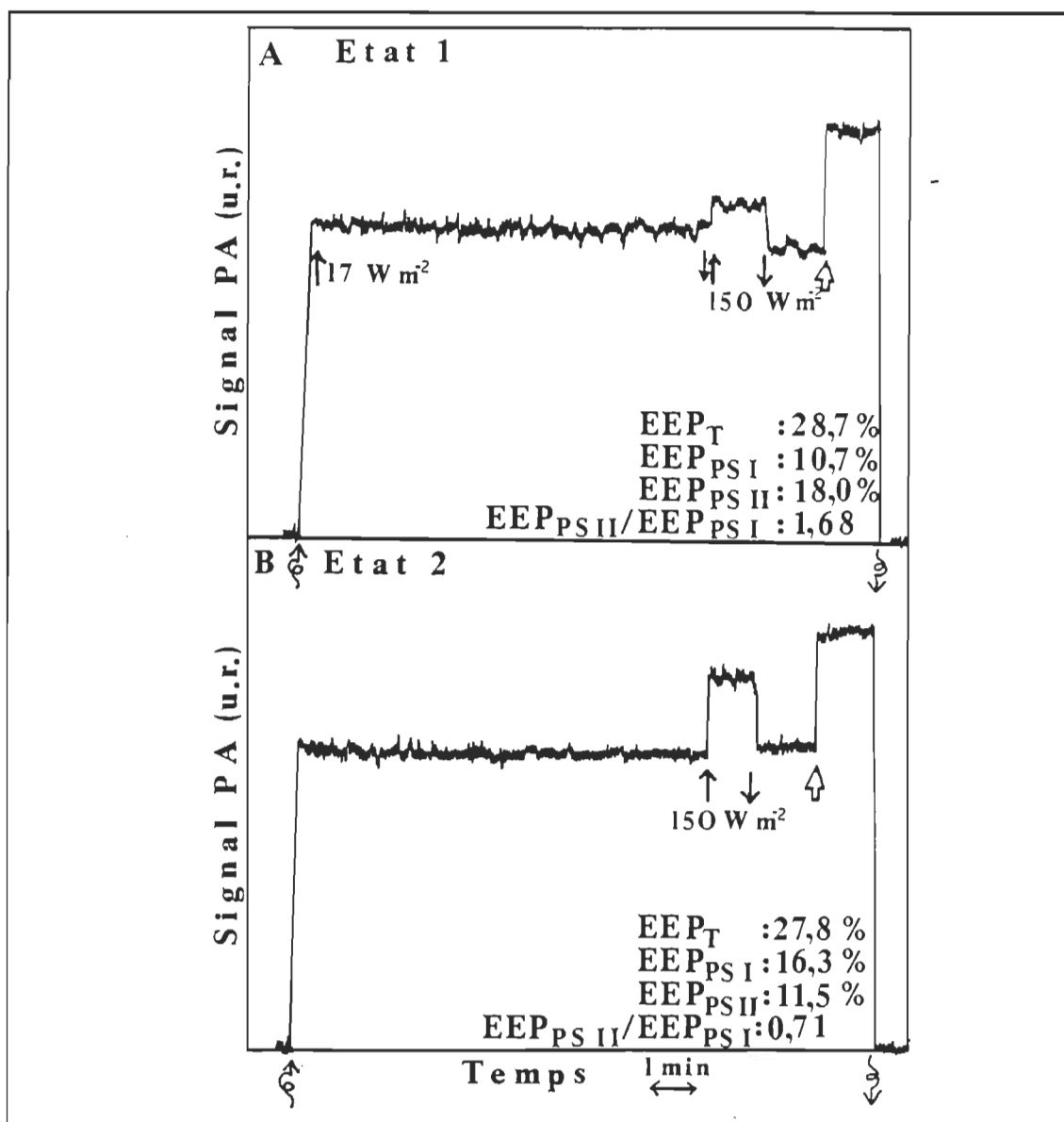


Figure 32: Signal PA typique d'une feuille d'érable à sucre dans l'état 1 (A) et dans l'état 2 (B). Les conditions sont similaires à celles de la figure 31. Les symboles sont similaires à ceux de la figure 30.

Ce phénomène s'est toujours révélé évident dans toutes nos expériences lors de la transition de l'état 1 vers l'état 2.

Si le mécanisme du "spill-over" (Biggins et Bruce, 1989) régissait les transitions d'état, une toute autre situation serait observée dans les valeurs d'EEP des deux PS. $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$ conserveraient leur valeur lors des transitions d'état. Comme le faisceau saturant rouge lointain induit une fermeture des centres réactionnels des PS I seulement, ce qui cause le relâchement de l'énergie modulée à 650 nm absorbée par

Tableau V

EEP_T , $EEP_{PS\ I}$, $EEP_{PS\ II}$, $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ et distribution
de la lumière entre le PS I (α) et le PS II (β)
pendant les transitions d'état chez des feuilles d'érable

Paramètre	État 1	État 2	État 1 - état 2
ES_T (%)	$27,3 \pm 3,7^*$	$26,9 \pm 3,4$	- 0,4
$ES_{PS\ I}$ (%)	$6,7 \pm 4,0$	$11,8 \pm 4,3$	+ 5,1
$ES_{PS\ II}$ (%)	$20,6 \pm 5,5$	$15,1 \pm 5,8$	- 5,1
$ES_{PS\ II}/ES_{PS\ I}$	3,1	1,3	-1,8
α	0,25	0,44	+ 0,19
β	0,75	0,56	- 0,19

*: Moyenne de 16 échantillons \pm écart-type.

ceux-ci, seul le transfert d'énergie du PS II vers le PS I ("spill-over") est restreint. Cette fraction non-dissipée d'énergie absorbée par le PS II peut instantanément être utilisée pour l'activité photochimique, puisque nos mesures sont effectuées sous des conditions lumineuses limitantes. De plus, le PS I oxydé en présence du faisceau rouge lointain peut encore plus facilement recevoir les électrons en provenance du PS II. Ainsi, $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$ ne devraient pas varier lors des transitions d'état, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Ceci constitue une évidence directe du concept de la variation des sections efficaces comme mécanisme régissant les transitions d'état.

Si on assume que $EEP_{PS\ I}$ et $EEP_{PS\ II}$ sont proportionnels à la quantité d'énergie modulée absorbée par le PS I et le PS II respectivement, α et β ¹² peuvent être déterminés, en posant comme prémisse que la somme de α et β vaut EEP_T ¹³. Un important débalancement de la distribution d'énergie entre les deux PS est observé dans l'état 1, puisqu'environ 75 % de l'énergie absorbée l'est par le PS II. Cette valeur se révèle supérieure aux 60 à 64 % enregistrées antérieurement *via* le dégagement d'O₂ en SPA (Canaani et Malkin, 1984 a) et les mesures de fluorescence (Malkin *et al.*, 1986). Suite à la transition vers l'état 2, ce débalancement est réduit jusqu'à un rapport 56:44 en faveur du PS II. Néanmoins, on doit noter que nos valeurs de α et β peuvent être légèrement faussées, puisque l'EEP ne dépend pas seulement de l'absorption lumineuse, mais aussi de la taille du bassin d'intermédiaires recevant les électrons, et de leur temps de demi-vie (Malkin et Cahen, 1979).

¹² α et β sont des coefficients d'absorption des PS I et PS II respectivement, permettant le calcul de la distribution d'énergie entre les deux photosystèmes.

¹³ On normalise EEP_T à 1, ce qui vaut $\alpha + \beta$.

Nous avons choisi d'utiliser le rapport entre $EEP_{PS\ II}$ et $EEP_{PS\ I}$ comme indicateur de l'état de transition pour l'étude cinétique des transitions d'état. Ce choix s'explique par notre volonté de nous doter d'un indicateur relié à l'activité des deux photosystèmes; l' EEP du PS I ou du PS II seul s'avérant trop variable d'une plante à une autre. Ce rapport se révèle toujours supérieur dans l'état 1, comparativement à l'état 2 (Tableau V). Le rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ décroît lors de la transition vers l'état 2, alors qu'il augmente lors de la transition vers l'état 1 (figure 33). Les deux cinétiques de transition sont

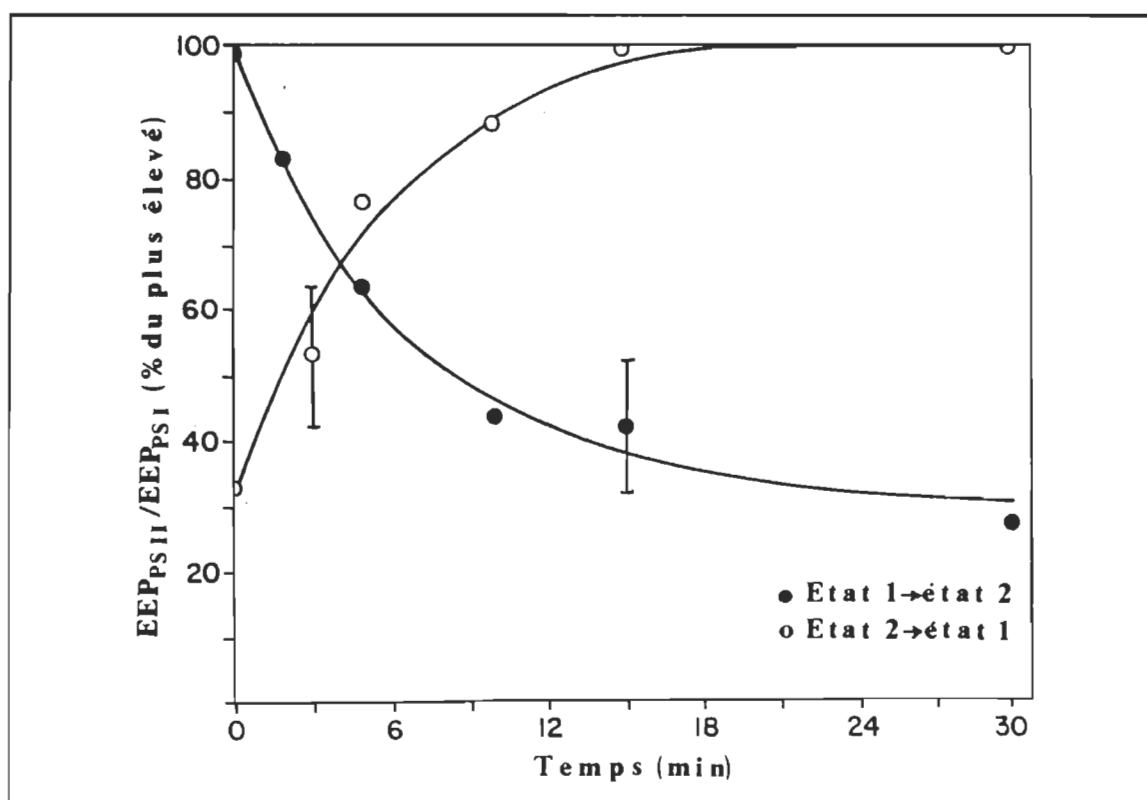


Figure 33: Variation du rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ dans le temps lors des transitions d'état de feuilles d'érable à sucre. Les disques de feuille ont été amenés à un état stationnaire (1 ou 2, selon le cas) pendant 30 min, avant la variation d'état (vers l'état 2 ou 1, selon le cas). Les conditions sont similaires à celles de la figure 31.

hautement symétriques l'une par rapport à l'autre. Elles se révèlent toutes deux complétées après environ 20 min, ce qui correspond au domaine de temps obtenu lors d'études antérieures (Canaani et Malkin, 1984).

Dans une autre série de mesures, la feuille a été pré-illuminée avec le faisceau saturant blanc, puis la transition vers l'état 1 ou 2 a été suivie. Le rapport $EEP_{PS II} / EEP_{PS I}$ diminue dans le temps lorsque des conditions d'illumination d'état 2 sont présentes, ce qui indique une transition d'état (figure 34). Ce phénomène n'est pas observé

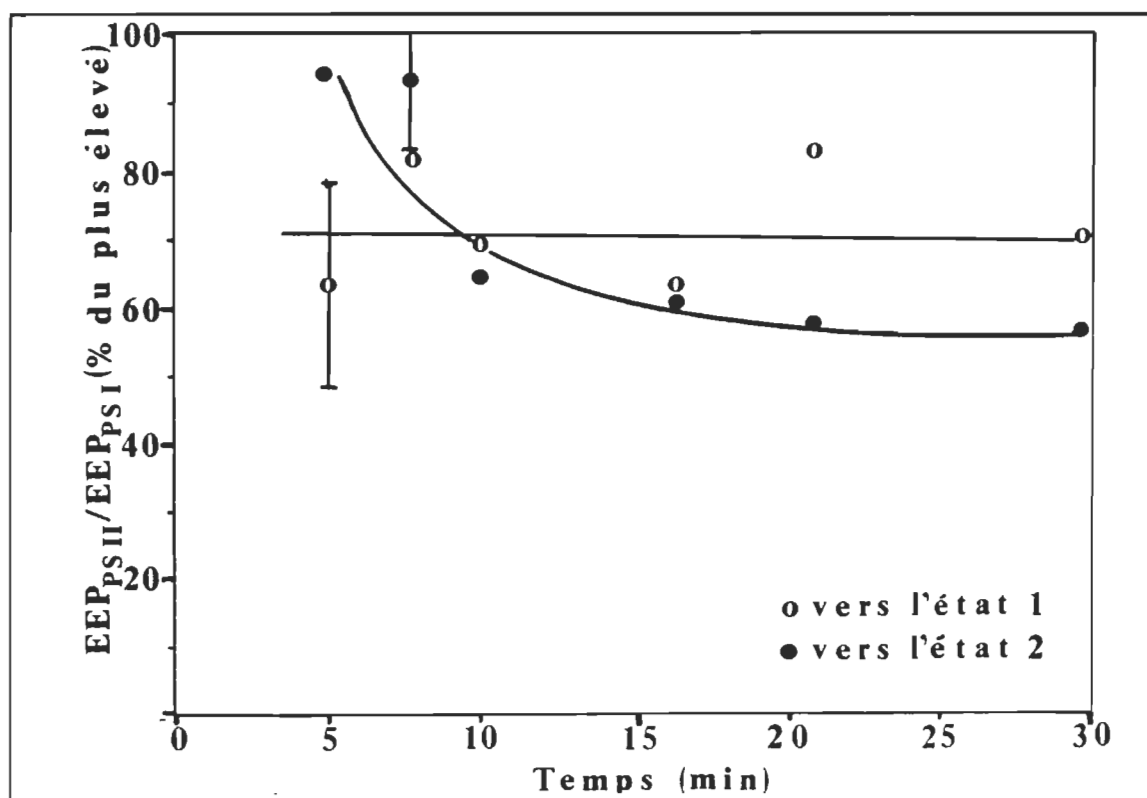


Figure 34: Variation du rapport $EEP_{PS II} / EEP_{PS I}$ dans le temps lors des transitions vers l'état 1 (o) ou 2 (●) de feuilles d'érable à sucre préilluminées 10 min avec le faisceau saturant blanc (160 W m^{-2}). Les autres conditions sont similaires à celles de la figure 31.

lors de l'illumination en état 1. Ceci confirme clairement l'association du CCL II mobile avec le PS II pendant une illumination avec de la lumière blanche.

La migration du CCL mobile entre les deux PS est expliquée par la phosphorylation réversible de cette protéine, réaction contrôlée par l'état d'oxydo-réduction du bassin de PQ ou du complexe cyt b_6-f (voir figure 6, page 33). Le fluorure de sodium (NaF), un inhibiteur des phosphatases, est reconnu pour empêcher la transition vers l'état 1 (Bennett, 1983, Canaani *et al.*, 1984). Nous avons donc infiltré des disques de feuilles avec une solution de NaF (à l'aide de la méthodologie développée dans le chapitre précédent), dans le but de nous assurer que les cinétiques observées étaient effectivement reliées aux transitions d'état. Nos témoins sont constitués de disques infiltrés par une solution de NaCl, afin d'éliminer un éventuel effet ionique.

Comme dans les études antérieures, la transition vers l'état 1 est inhibée par le NaF, contrairement à ce que nous obtenons avec le NaCl (Tableau VI). Cependant, nous avons noté une diminution d'environ 30 % de la valeur d' EEP_T chez les feuilles infiltrées au NaF, qui peut être attribuée à l'inhibition des phosphatases impliquées dans le cycle de Calvin-Benson, puisque le NaF n'est pas un inhibiteur spécifique. Si cette inhibition devait avoir un effet sur la transition vers l'état 1, elle présenterait aussi un effet sur l'état 2, ce qui n'est pas le cas, puisque les disques traités au NaF montrent un état 2 bien démarqué.

Nous avons constaté pendant ces mesures que le rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$, particulièrement dans l'état 1, se révèle fort différent entre les plantules de 5 - 7 ans et les

Tableau VI

Effet de l'infiltration de NaF* ou de NaCl sur
les transitions d'état de semis d'érable à sucre

Solution	EEP _{PS II} /EEP _{PS I}		% augmentation p/r à l'état 2
	État 1	État 2	
NaCl	5,8 ± 1,4**	1,9 ± 0,4	209 ± 60
NaF	2,2 ± 1,4	1,4 ± 0,6	57 ± 40

*: Les solutions 0,125 M de NaCl ou de NaF sont préparées dans un
tampon 0,2 M phosphate à pH 7.

**: Moyenne de 5 échantillons ± écart-type.

semis. Ceci s'explique fort probablement par les différences physiologiques entre les
plantes, différences liées aux conditions d'éclairement lors de leur croissance.

J'ai présenté au cours des dernières pages une méthode que nous estimons directe
pour mesurer l'activité photosynthétique des deux photosystèmes. Cette étude nous
donne des évidences directes de la variation des sections efficaces des photosystèmes lors
des transitions d'état. Comme il n'y a pas de perte d'EEP_T lors des transitions d'état,

les gains ou pertes d'énergie absorbée par le PS II sont corrélées avec les pertes ou les gains, respectivement, du PS I. Les fractions d'énergie échangées entre les photosystèmes représentent environ 5 % de l'énergie absorbée, 19 % de l'EEP_T, 34 % de l'EEP_{PS II} et 43 % de l'EEP_{PS I} dans l'état 2, pour ce qui est de l'érable à sucre.

5.3 Variation spectrale de EEP_T, EEP_{PS I} et EEP_{PS II}

L'activité relative de chacun des deux photosystèmes, et leur contribution à l'emmagasinement d'énergie total dans des conditions *in vivo*, i.e. en l'absence de composés modulateurs de l'activité photosynthétique (donneurs et/ou accepteurs d'électrons) dans une feuille intacte n'ont été que très peu étudiées. Quelques travaux ont porté sur ce sujet en utilisant le dégagement d'O₂ par polarographie ou par la méthodologie PA, en utilisant des algues ou des feuilles entières (Ried, 1972, Canaani et Malkin, 1984 a, Havaux *et al.*, 1986 b). Néanmoins, beaucoup de travail reste à faire afin de comprendre l'activité de chacun des deux photosystèmes dans le domaine de la radiation photosynthétiquement active (RPA). Nous avons donc étudié cet aspect de la photosynthèse chez l'érable à sucre.

Comme nous voulons déterminer l'activité de chacun des deux photosystèmes à différentes longueurs d'onde, nous nous sommes assurés dans un premier temps que notre méthodologie se révélait applicable à l'intérieur du domaine de la RPA. Nous avons donc sélectionné quatre longueurs d'onde (470, 560, 640 et 680 nm) afin de vérifier la saturation du signal PA par le faisceau continu rouge lointain (figure 35).

L' $EEP_{PS I}$ s'avère saturé à environ 90 W m^{-2} ; une augmentation de cette intensité ne produit aucune variation supérieure du signal PA. Ceci nous démontre encore une fois que le faisceau saturant rouge lointain n'est pas absorbé par le PS II. Le cas échéant, un accroissement de l'intensité du faisceau saturant rouge lointain aurait

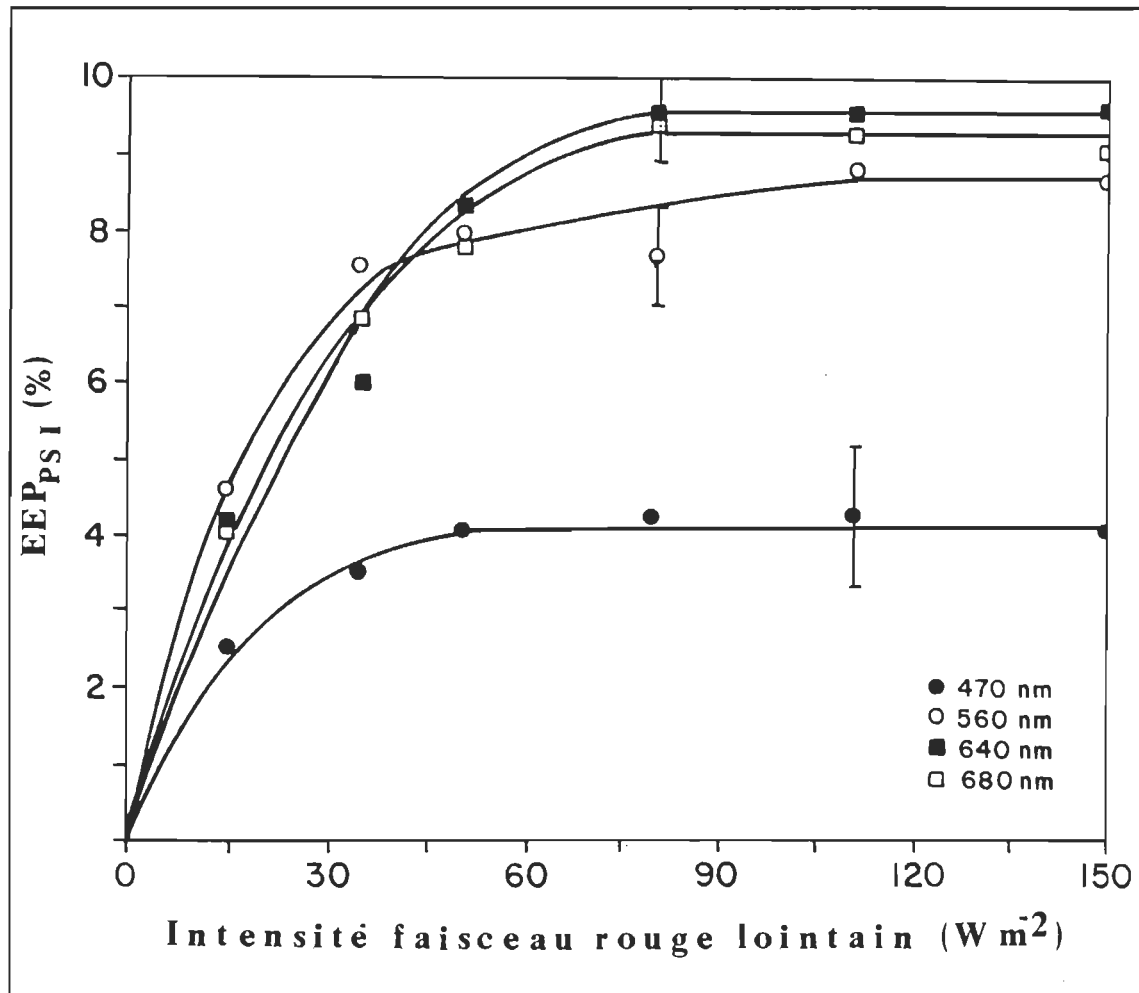


Figure 35: Effet de l'intensité du faisceau saturant rouge lointain sur la mesure d' $EEP_{PS I}$ de feuilles d'érable à sucre à 470 nm (●), 560 nm (○), 640 nm (■) et 680 nm (□). Faisceau modulé: 80 Hz; Faisceau saturant blanc: 300 W m^{-2} ; Faisceau saturant rouge lointain: $\lambda > 715 \text{ nm}$.

augmenté la quantité de PS II fermés, ce qui aurait causé une élévation de l'émission de chaleur en provenance du PS II, empêchant ainsi l'établissement du plateau. Suite à ces résultats, nous avons choisi de travailler sous des intensités du faisceau saturant rouge lointain de 150 W m^{-2} .

A un tout autre niveau, on peut constater que l'activité du PS I se révèle plus faible dans la région bleue du spectre que dans la région rouge. Nous y reviendrons un peu plus tard.

Le faisceau modulé peut par lui-même induire une fermeture partielle des centres réactionnels (Bults *et al.*, 1982). Nous avons tenté de déterminer l'intensité lumineuse limitant la photosynthèse chez l'érable à sucre, c'est-à-dire l'intensité en-dessous de laquelle l'EEP demeure constant. Nous avons effectué ces mesures aux quatre longueurs d'onde pré-citées afin de mieux connaître l'efficacité spectrale de l'activité photo-chimique (figure 36). Le signal PA obtenu lors de l'illumination par le faisceau saturant blanc étant proportionnel à la quantité de lumière absorbée par l'échantillon (Bults *et al.*, 1982), nous l'avons utilisé comme paramètre de l'intensité lumineuse absorbée (Herbert *et al.*, 1990). L'EEP_T se révèle fortement dépendant de l'intensité modulée employée, puisqu'il est maximum aux faibles intensités lumineuses modulées pour toutes les longueurs d'onde, et décroît au fur et à mesure de l'augmentation du faisceau modulé, en accord avec des études antérieures (Bults *et al.*, 1982, Carpentier *et al.*, 1984, Havaux *et al.*, 1989).

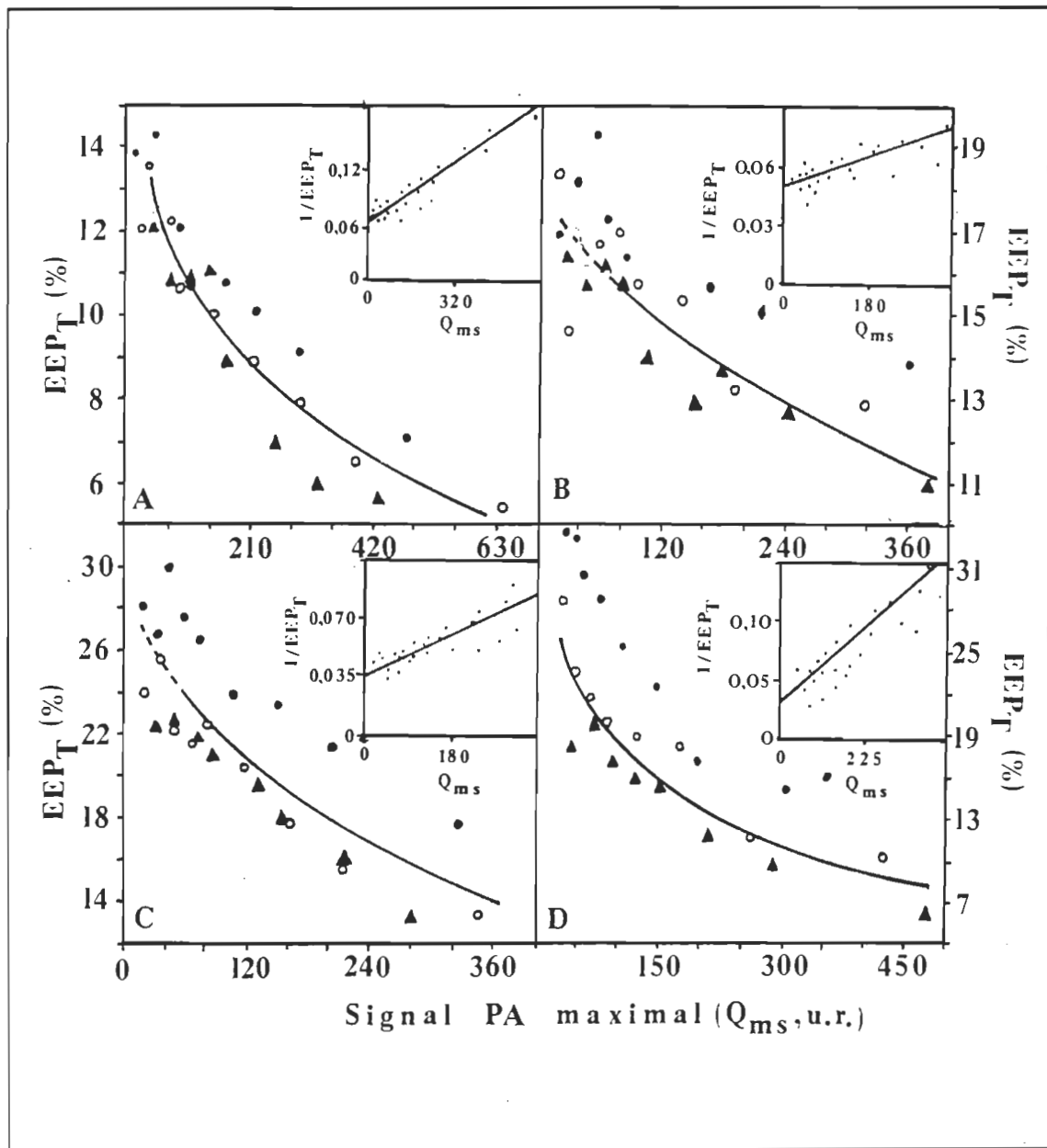


Figure 36: Effet de l'intensité du faisceau modulé (exprimée par le signal PA en présence du faisceau saturant blanc (Q_{ms})) sur la mesure de l' EEP_T de feuilles d'érable à sucre à 470 nm (A), 560 nm (B), 640 nm (C) et 680 nm (D). Les différents symboles représentent différents échantillons.

Inserts: Inverse de l' EEP_T en fonction de l'intensité lumineuse. Conditions similaires à celles de la figure 35.

Il a été démontré dans une étude récente qu'il existe des intensités lumineuses limitant l'emmagasiner d'énergie chez certaines algues (Herbert *et al.*, 1990). Dans notre étude, ce phénomène se révèle difficile à évaluer, à cause du faible rapport signal/bruit aux faibles intensités lumineuses. Néanmoins, nous sommes tentés de conclure, malgré la dispersion des points expérimentaux, qu'il existe un tel plateau pour l'EEP chez l'érable à sucre, particulièrement à 560 et 640 nm. De plus, nous pouvons constater que le phénomène de saturation de la photosynthèse est moins intense à 560 nm (vert), qu'à 470 nm (bleu) ou 640 et 680 nm (rouge).

Afin de connaître l'efficacité photochimique maximale de la feuille, l'inverse de l'EEP_T est exprimé selon l'intensité du signal PA (Carpentier *et al.*, 1985, Havaux *et al.*, 1989). Ces graphiques présentent une relation linéaire entre 1/EEP_T et l'intensité lumineuse (inserts de la figure 36). L'EEP_T maximal, un indicateur de l'efficacité photochimique, est dépendant de la longueur d'onde. Il se révèle optimal à 680 nm et minimal à 470 nm (Tableau VII). De plus, la pente de ce type de graphique, qui indique le taux de saturation lumineuse de la photosynthèse, varie elle aussi selon la qualité de lumière (Tableau VII). Le taux est minimal à 560 nm, ce qui montre le faible effet de saturation de la lumière verte. A l'inverse, le taux se révèle maximal à 680 nm, ce qui suggère que le faisceau modulé à 680 nm sature efficacement les centres réactionnels, même à faible intensité lumineuse.

Les rendements quantiques relatifs de l'EEP_T, l'EEP_{PS I} et de l'EEP_{PS II} ont été déterminés entre 400 et 720 nm (figure 37). Afin d'obtenir des valeurs de rendement quantique d'EEP qui tiennent compte de l'intensité lumineuse variable à chaque lon-

gueur d'onde et l'énergie de chacune de ces longueurs d'onde, nous devons diviser le spectre d'EEP par un spectre obtenu avec un noir de charbon (qui représente finalement le spectre de la lampe) et par la longueur d'onde employée (Malkin *et al.*, 1990).

Tableau VII

Effet de la longueur d'onde sur l'efficacité photochimique
maximale* et le taux de saturation de la photosynthèse**
de feuilles d'érable à sucre

Longueur d'onde (nm)	Efficacité photochimique maximale (%)	Taux de saturation (x 10 ⁻⁴ %)
470	14,6 ***	2,2
560	18,2	0,8
640	27,8	1,1
680	33,8	2,4

*: Obtenue par l'ordonnée à l'origine du graphique $1/EEP_T$ en fonction de l'intensité lumineuse absorbée (exprimée par le signal PA maximal).

**: Obtenu par la pente du graphique $1/EEP_T$ en fonction de l'intensité lumineuse absorbée (exprimée par le signal PA maximal).

***: Les droites représentées proviennent de la moyenne de trois échantillons.

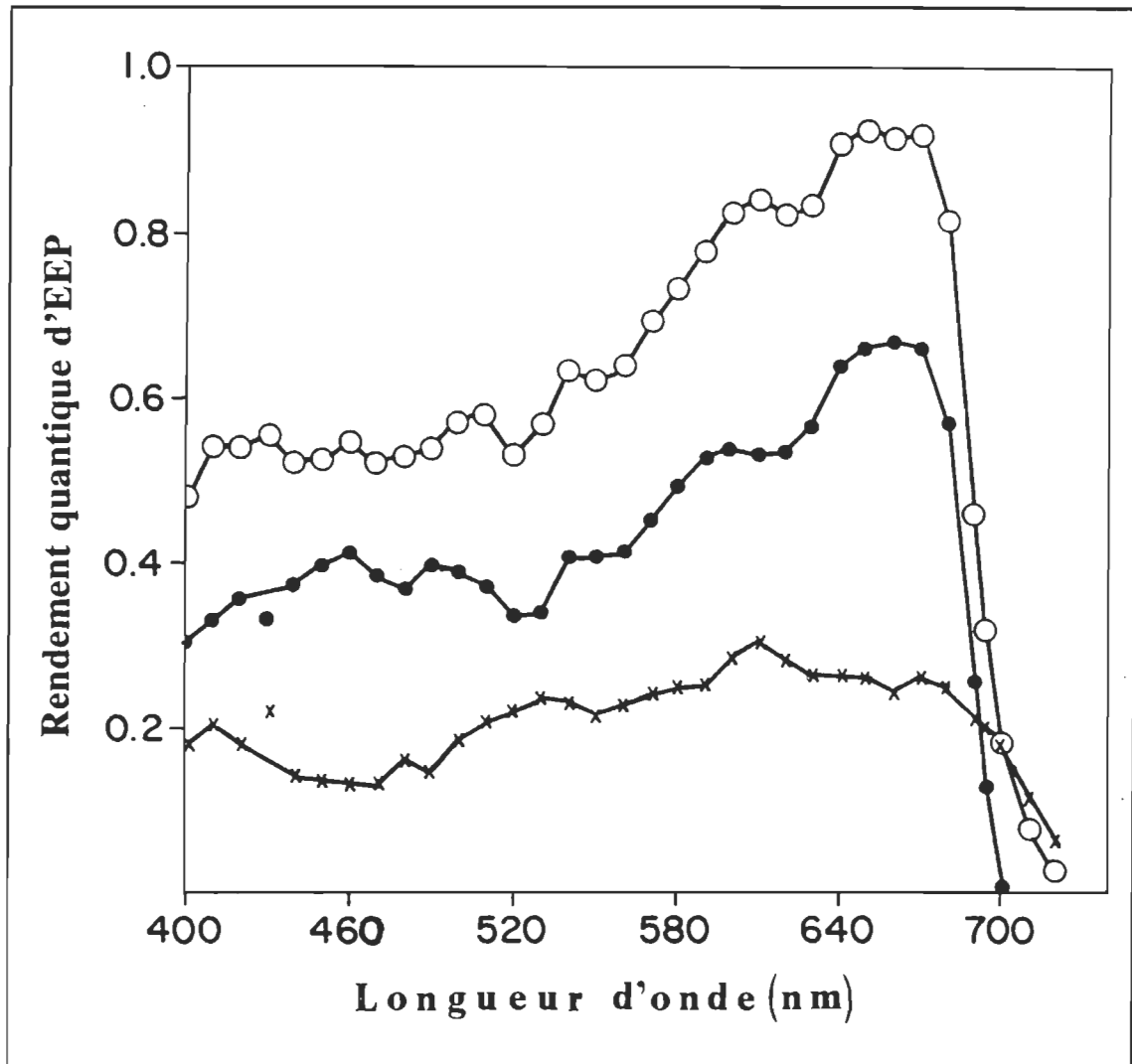


Figure 37: Rendement quantiques d'EEP_T (○), d'EEP_{PS I} (x) et d'EEP_{PS II} (●) de feuilles d'érable à sucre. Conditions similaires à celles de la figure 35.

Comme nous estimons travailler à une intensité limitant la photosynthèse (où à tout le moins très près de celle-ci), l'EEP est considéré comme étant inversement proportionnel à l'énergie absorbée, ce qui nous oblige à multiplier le spectre par Q_{ms} (Herbert *et al*, 1990). Ainsi le rendement quantique est exprimé par:

$$\Phi_{EEP} = EEP \cdot Q_{ms} \cdot \frac{1}{\lambda} \quad (24)$$

Le spectre de rendement quantique d'EEP_T montre des caractéristiques similaires à ce que nous avons obtenu précédemment avec nos mesures ponctuelles. L'efficacité photochimique se révèle inférieure dans la région du bleu que dans la région du rouge. Le spectre en lui-même présente deux pics à environ 610 et 660 nm. L'efficacité chute à partir de 680 nm, montrant l'effet d'affaissement de l'activité photosynthétique dans le rouge, phénomène déjà bien caractérisé (Emerson et Lewis, 1943, Malkin *et al.*, 1990). En général, les caractéristiques spectrales demeurent similaires d'un échantillon à l'autre. Le spectre d'action de EEP_T se révèle similaire à ceux des rendements quantiques de dégagement d'O₂ et d'EEP_T mesuré par la méthodologie PA chez le tabac (Canaani et Malkin, 1984 b).

Le spectre de rendement quantique du PS I, par contre, diffère considérablement des spectres publiés antérieurement, effectués sur des chloroplastes isolés d'algues vertes ou de plantes supérieures (Joliot *et al.*, 1968, Ried, 1972). Nous obtenons une activité du PS I inférieure dans la région bleue du spectre en comparaison avec la région rouge, ce qui contraste avec les résultats pré-cités où l'activité dans la région bleue se révélait équivalente à celle observée dans la région rouge. La méthodologie utilisée par ces auteurs pour évaluer l'activité du PS I, à savoir les échanges d'oxygène survenant à la suite d'un flash lumineux, s'avère entachée de contributions non-relées au PS I (entre

autres aux transitions d'état), donc faussée. Elle n'est d'ailleurs plus utilisée de nos jours.

Le spectre de rendement quantique du PS I présente deux bandes situées à 610 et 670 nm, qui peuvent être attribuées à l'absorption de la chlorophylle a, et un large pic centré à 530 nm. Le minimum observé entre 430 et 480 nm suggère que la chlorophylle b et les caroténoïdes, les pigments absorbant dans cette région (Goedheer, 1966, Goodwin, 1980), sont moins associés avec le PS I (Boardman, 1971). Il demeure possible d'observer une certaine valeur d' $EEP_{PS\ I}$ entre 700 et 720 nm, ce qui indique l'EEP liée au transport cyclique des électrons autour du PS I ($EEP_{PS\ I-cy}$, Herbert *et al.*, 1990).

Soit dit en passant, cet $EEP_{PS\ I-cy}$ est sensible au DCMU chez des plantes à la photosynthèse en C_3 , telles le haricot et *Oxalis* (Herbert *et al.*, 1990). Chez l'érable à sucre, même après 3 h de flottaison sur une solution de 25 μM de DCMU, nous pouvons encore observer l' $EEP_{PS\ I-cy}$.

Quant au spectre de rendement quantique de l' $EEP_{PS\ II}$, il présente une activité moindre du PS II dans la région bleue du spectre que dans la région rouge. Il diffère des précédents spectres publiés puisqu'on peut y observer une activité importante dans la région verte du spectre. De larges bandes d'absorption sont observées à 460, 490, 600 et 660 nm, en plus d'un large épaulement entre 530 et 560 nm. Il est à noter toutefois que la présence de cet épaulement n'est pas observée dans tous les échantillons. L'activité photochimique décroît au-delà de 680 nm, ce qui explique l'affaissement dans le rendement quantique du dégagement d' O_2 (Canaani et Malkin, 1984 a).

L' $EEP_{PS II}$ se révèle supérieur à l' $EEP_{PS I}$ entre 400 et 690 nm, probablement à cause de la présence de grands bassins d'intermédiaires chimiques entre le PS II et le PS I. Comme le spectre d'action reflète l'absorption lumineuse par les pigments accessoires des photosystèmes, nous pouvons déduire que les deux photosystèmes absorbent entre 400 et 700 nm, bien que la distribution de l'énergie doive être en faveur du PS II. Au-delà de 700 nm, l'absorption semble être dirigée vers le PS I.

Les spectres d'action d' EEP_T et d' $EEP_{PS II}$ ressemblent aux spectres d'action de la fixation du CO_2 obtenus avec des feuilles de différentes espèces (McCree, 1971, Clark et Lister, 1975, Inada, 1976). La diminution de l'efficacité photochimique dans la région bleue du spectre s'avère responsable du faible taux de fixation de CO_2 dans cette région spectrale (Inada, 1976).

En conclusion, nous avons démontré au cours des dernières pages que la mesure des rendements quantiques de l'activité photochimique des deux photosystèmes était possible *in vivo* en utilisant la SPA. De façon générale, l'efficacité photochimique se révèle inférieure dans la région bleue du spectre, en comparaison avec la région rouge. L'activité du PS II est dominante entre 400 et 690 nm, décroissant rapidement au-delà. L'activité du PS I a pu être observée entre 700 et 720 nm, indiquant l'emmagasinement d'énergie impliqué dans le transport cyclique d'électrons autour du PS I.

Avec les travaux rapportés dans ce chapitre, j'ai répondu à certains objectifs de départ. J'ai d'abord développé une méthodologie photoacoustique me permettant de déterminer l'activité photosynthétique de chacun des deux photosystèmes *in vivo*. Cette

méthode s'avère unique puisqu'elle permet de mesurer l'activité photosynthétique des deux photosystèmes à l'aide de paramètres communs, alors que, jusqu'à maintenant, différentes techniques étaient requises.

Par la suite, j'ai utilisé cette méthodologie afin d'étudier l'effet d'une variation qualitative de la lumière incidente sur l'appareil photosynthétique. Les transitions d'état constituent un mécanisme physiologique permettant une redistribution de l'énergie quantique incidente lors d'une sur-énergisation de l'un ou l'autre des deux photosystèmes. Finalement, j'ai analysé la contribution de chacun des deux photosystèmes *in vivo* à l'activité photosynthétique à l'intérieur de la radiation photosynthétiquement active.

Cette méthodologie sera appliquée, entre autres, à l'étude de l'effet de la quantité de lumière (stress photoinhibiteur) sur l'appareil photosynthétique au prochain chapitre.

CHAPITRE 6

EFFETS DE LA PHOTOINHIBITION

6.1 Sur l'activité des photosystèmes I et II

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le PS II constitue le site primaire de l'action inhibitrice de la photoinhibition (Critchley, 1988). Outre l'inactivation du PS II, les hautes intensités lumineuses peuvent provoquer des dommages au PS I (Harvey et Bishop, 1978, Powles, 1984, Inoue *et al.*, 1986). De manière générale toutefois, le PS I s'est révélé plus tolérant à la photoinhibition que le PS II (Critchley, 1981, Tyystarvi *et al.*, 1989). Ces études ont majoritairement porté sur des algues ou sur des chloroplastes isolés de feuilles soumises à un stress de haute intensité lumineuse, en présence de modulateurs artificiels de l'activité photosynthétique (Critchley, 1981, Satoh et Fork, 1982, Tyystarvi *et al.*, 1989). Récemment, l'activité du PS I associée au transport cyclique des électrons a été démontrée comme étant résistante à la photoinhibition, en utilisant la SPA (Canaani *et al.*, 1989, Havaux et Eyletters, 1991). Cependant, peu d'informations sont disponibles quant à la nature de l'effet, *in vivo*, des hautes intensités lumineuses sur le PS I chez les plantes supérieures.

Cette résistance du PS I à la photoinhibition peut être perçue comme étant un mécanisme de protection. En effet, le transport cyclique d'électrons tend à augmenter le taux de synthèse d'ATP, ce qui se révèle primordial pour combler les besoins énergétiques de la synthèse de protéines *de novo*.

Dans un autre ordre d'idées, la phosphorylation du CCL II, et sa dissociation du PS II, sont aussi considérées comme étant des modes de protection du PS II contre les hautes intensités lumineuses (Horton et Lee, 1985). L'activité de la kinase responsable de la phosphorylation du CCL II est contrôlée par l'état redox du bassin de PQ (Fork et Satoh, 1986, voir introduction). Cette activité est reconnue comme étant élevée sous de hautes intensités lumineuses (Horton et Lee, 1985). A l'inverse, il a été démontré que la photoinhibition inhibait cette kinase (Schuster *et al.*, 1986) et affectait les transitions d'état chez *Chlamydomonas* (Canaani *et al.*, 1989). Il existe donc une certaine controverse au sujet du contrôle de la distribution de l'énergie lumineuse pendant la photoinhibition.

En utilisant la méthodologie permettant l'étude de l'activité des PS I et PS II, que nous avons développée dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés à l'activité des deux PS pendant la photoinhibition chez l'érable à sucre.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je me permets un petit aparté sur les différentes mesures d'EEP qui seront utilisées au cours des prochaines pages, ceci afin d'éviter toute confusion. L'illumination avec un faisceau modulé de 650 nm permet de mesurer l'EEP des deux photosystèmes, ensemble ou séparément, tel que démontré dans le chapitre 5 (Veeranjaneyulu *et al.*, 1990). L'emploi d'un faisceau modulé à 705 nm permet de déterminer l'EEP relié à l'activité du transport cyclique autour du PS I ($EEP_{PS\ I-cy}$, Canaani *et al.*, 1989, Herbert *et al.*, 1990). La figure 38 illustre les mesures effectuées en vue de mesurer l'activité photosynthétique du PS I à 705 nm. L' $EEP_{PS\ I-cy}$ constitue la

différence du signal PA avec (Q_{m705s}) et sans (Q_{m705}) le faisceau saturant blanc, telle qu'exprimée par la relation:

$$EEP_{PSI-cy} = \frac{Q_{m705s} - Q_{m705}}{Q_{m705s}} \cdot 100 \quad (25)$$

L'activité du PS I, dépendante du PS II (EEP_{PSI-li}) est mesurée en présence (Q_{m705bv}) et en absence (Q_{m705}) d'un faisceau saturant bleu-vert. Ce type de faisceau a été choisi comme lumière saturant l'activité du PS II, puisque l'activité du PS I est faible dans ce domaine spectral (voir chapitre précédent). L' EEP_{PSI-li} est décrit par la relation:

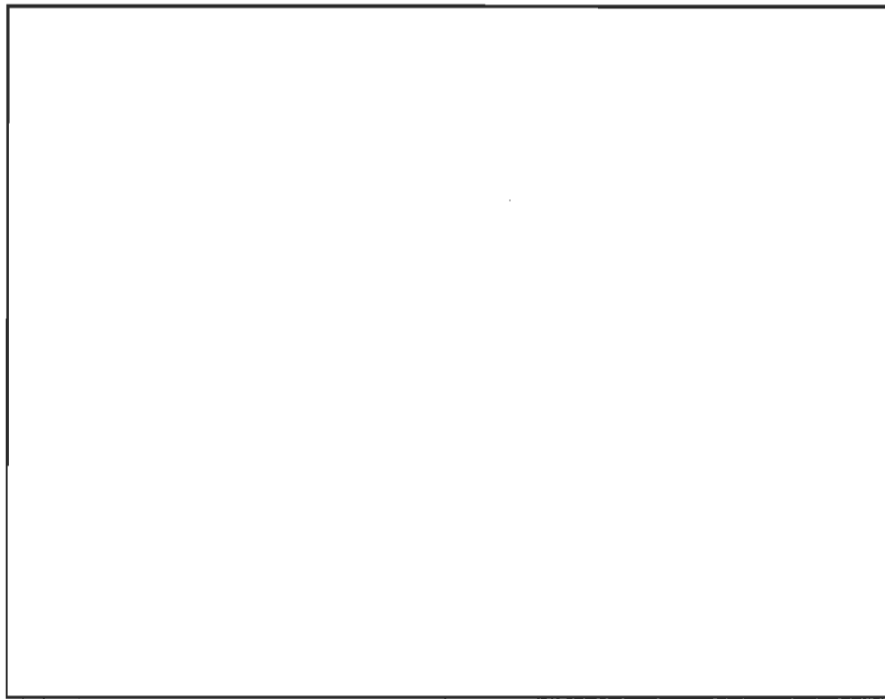


Figure 38: Signal PA d'une feuille d'érable à sucre enregistré à 705 nm. Les flèches ondulées pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau modulé (705 nm, 2,4 W m⁻²; 100 Hz). Les flèches épaisses pointant vers le haut et le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant blanc (330 W m⁻²). Les flèches brisées pointant vers le haut et vers le bas représentent l'illumination et l'extinction, respectivement, du faisceau saturant bleu-vert (25 W m⁻²).

$$EEP_{PSI-H} = \frac{Q_{m705} - Q_{m705bv}}{Q_{m705s}} \cdot 100 \quad (26)$$

Le traitement photoinhibiteur ($1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$, 1 h) induit une diminution de l'activité photosynthétique totale de la feuille, comme en fait foi la baisse de EEP_T (Tableau VIII). Cette diminution représente environ 25 % de l'activité initiale. Il se révèle intéressant de constater que, de façon individuelle, l'activité du PS II diminue d'environ 35 %, alors que celle du PS I augmente d'environ 60 %. Ceci démontre que le PS II est spécifiquement inhibé par le traitement photoinhibiteur, en accord avec les études antérieures, alors que le PS I voit son activité augmenter.

Les valeurs d' EEP_{PSI} des semis se révèlent bien inférieures à celles observées chez les plantules. Ces faibles valeurs sont responsables des hauts rapports EEP_{PSII}/EEP_{PSI} mesurés chez les semis. Ce rapport devient 3 à 5 fois plus élevé chez les semis, en comparaison avec celui de plantules d'érable (Veeranjaneyulu *et al.*, 1990, voir chapitre 5). Ceci nous porte à croire que l'activité du PS I, ou la population de PS I, serait faible chez les semis, en comparaison avec celles des plantules. Ainsi, le PS I deviendrait un facteur limitant au transport d'électrons en provenance du PS II chez les semis. Une telle condition se produit lorsque le rapport stoechiométrique des PS II sur les PS I est supérieur à un. Ceci demeure possible puisque ce rapport varie selon les conditions de croissance et l'espèce étudiée (Jursinic et Dennenberg, 1989). Nous en discuterons un peu plus loin.

Une étude de la variation de l'activité des deux photosystèmes pendant le traitement photoinhibiteur montre des tendances inversées (figure 39). L'EEP_T diminue graduellement en cours de traitement, principalement à cause de la baisse de l'EEP_{PS II}. On note pendant cette même période une augmentation de l'EEP_{PS I}.

Tableau VIII
Effet d'un traitement photoinhibiteur* sur
l'activité photosynthétique des PS I et PS II
de feuilles d'érables à sucre

Paramètre	Témoin	Traitement
EEP _T (%)	32,2 ± 3,4 ..	23,6 ± 3,9
EEP _{PS I} (%)	3,5 ± 0,7	5,6 ± 1,8
EEP _{PS II} (%)	28,7 ± 4,4	18,0 ± 5,1
EEP _{PS II} / EEP _{PS I}	8,2 ± 2,2	3,9 ± 2,8
EEP _{PS I-cy} (%)	5,4 ± 2,0	6,6 ± 1,3
EEP _{PS I-li} (%)	7,1 ± 2,5	8,5 ± 2,5

*: Traitement: 1 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1 h.

**: Moyenne de 6 échantillons ± écart-type.

Soit dit en passant, le rapport A_{O_2}/A_{PT} , représentant le rendement quantique relatif du dégagement d' O_2 (Bults *et al.*, 1982 a), décroît aussi suite au traitement photoinhibiteur. Cette décroissance de A_{O_2}/A_{PT} se révèle parallèle à celle observée sur $EEP_{PS II}$ (figure 40). Ceci démontre clairement la pertinence d'employer $EEP_{PS II}$ comme indicateur de l'activité photosynthétique du PS II.

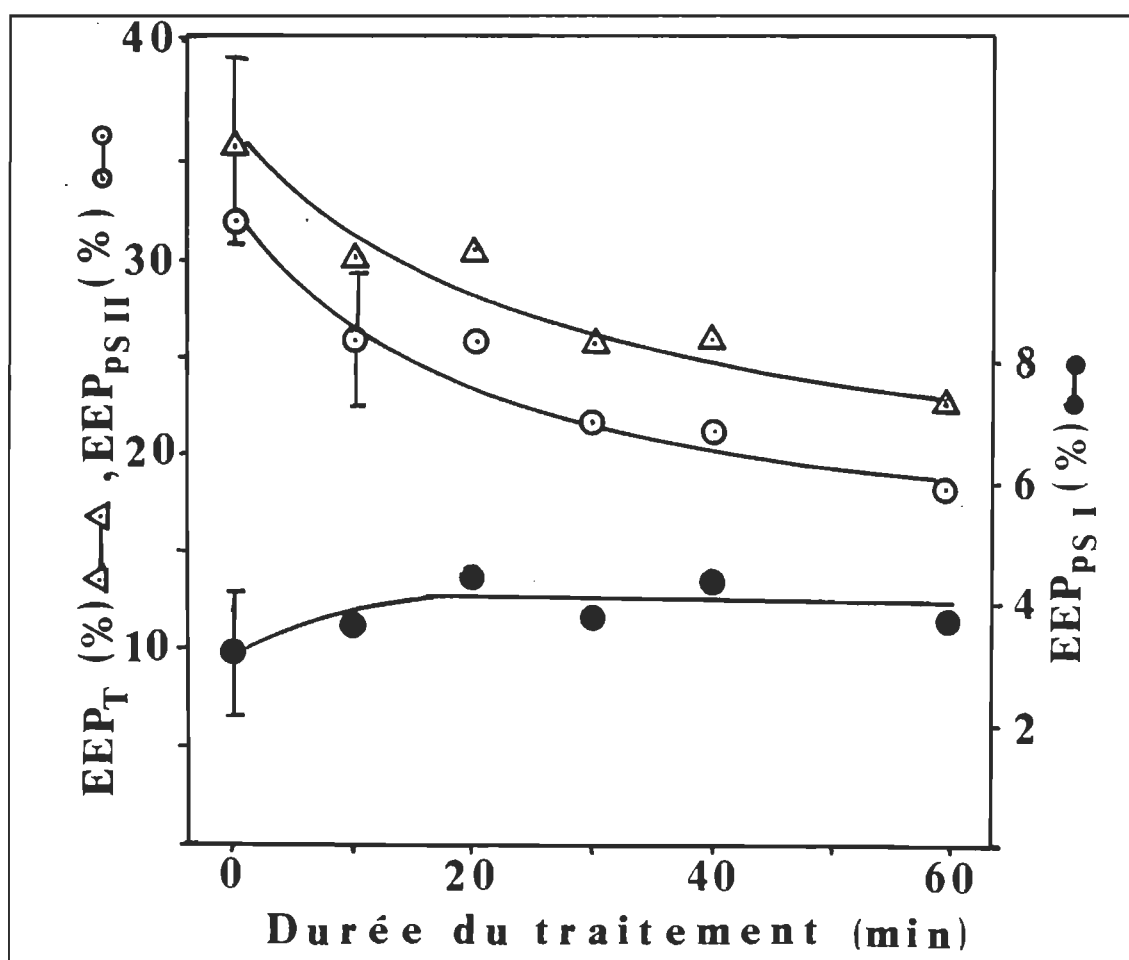


Figure 39: Variation de EEP_T , $EEP_{PS I}$ et $EEP_{PS II}$ dans le temps pendant le traitement photoinhibiteur ($1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) de feuilles d'érable à sucre. λ : 650 nm, $2\ \text{W m}^{-2}$; faisceau saturant rouge lointain: $150\ \text{W m}^{-2}$. Les autres conditions sont similaires à celles de la figure 38.

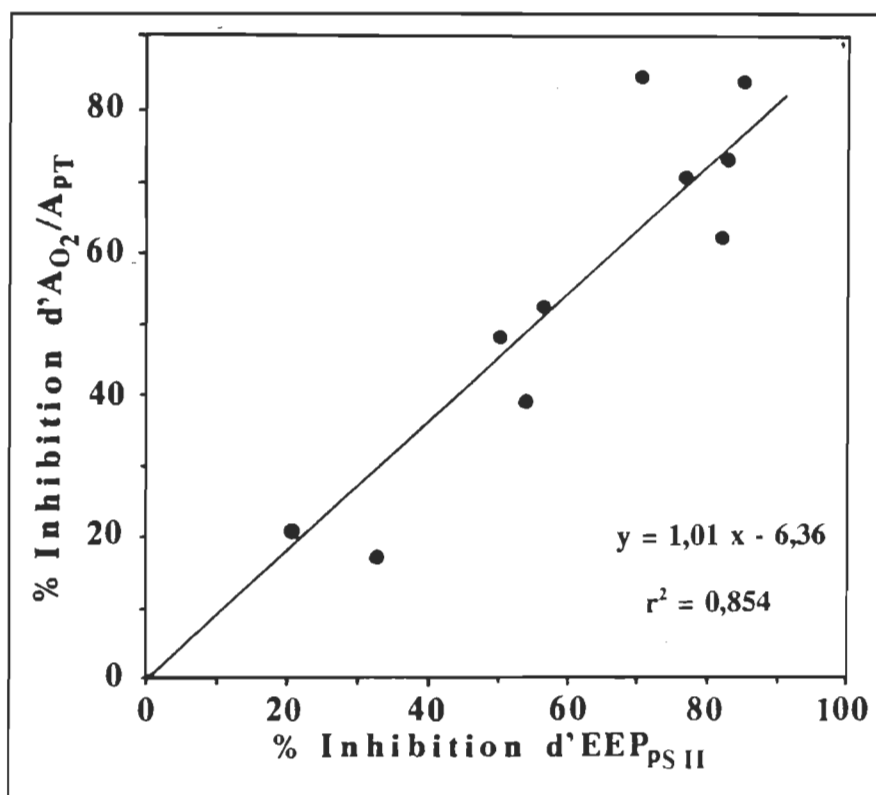


Figure 40: Corrélation entre les effets produits par le traitement photoinhibiteur sur le rapport A_{O_2}/A_{PT} et l'EEP_{PS II} de l'érable à sucre. Les conditions sont similaires à celles de la figure 39.

L'âge des feuilles traitées constitue une caractéristique importante de l'effet inhibiteur du stress de haute intensité lumineuse. Les jeunes feuilles sont beaucoup plus affectées par le traitement photoinhibiteur que les feuilles matures. On note une diminution d'environ 75 % de l'EEP_T, principalement causée par la chute d'environ 85 % de l'EEP_{PS II} (Tableau IX). Les effets photoinhibiteurs se révèlent ainsi trois fois plus importants chez les jeunes feuilles. Malgré la baisse drastique de l'activité du PS II, l'EEP_{PS I} augmente légèrement suite au traitement.

Tableau IX
Effets d'un traitement photoinhibiteur* sur
l'activité photosynthétique de feuilles
de semis d'érable à sucre et de bleuetiers

Paramètre	Témoin	Traitement
Feuilles de semis d'érable à sucre		
EEP _T (%)	33,6 ± 5,2 **	8,2 ± 1,9
EEP _{PS I} (%)	2,2 ± 0,5	2,6 ± 0,8
EEP _{PS II} (%)	31,4 ± 5,7	5,6 ± 2,0
Feuilles de bleuetiers		
EEP _T (%)	19,6 ± 3,6 ***	13,8 ± 2,4
EEP _{PS I} (%)	2,5 ± 0,7	3,0 ± 1,5
EEP _{PS II} (%)	17,1 ± 4,3	10,8 ± 3,5

*: Traitement: 1 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1 h.

**: Moyenne de 5 échantillons ± écart-type.

***: Moyenne de 9 échantillons ± écart-type.

Nous avons vérifié si cette augmentation de l'activité du PS I, observée à la fois chez les jeunes feuilles et chez les feuilles matures de l'érable à sucre, était spécifique. Les feuilles de bleuetiers montrent elles aussi une hausse de l'activité du PS I (Tableau IX). Encore ici, cette hausse est observée malgré une chute de l'activité du PS II lors du traitement photoinhibiteur. Ainsi, notre étude démontre clairement que la photoinhibition induit une augmentation de l'activité du PS I et inhibe spécifiquement l'activité du PS II.

Dans un autre ordre d'idées, une augmentation du taux de désexcitations non-radiatives, telle que mesurée en SPA, est rapportée suite à un traitement photoinhibiteur (Buschmann, 1987, Havaux, 1989). Les mesures d'émission de fluorescence en viennent aux mêmes conclusions (Krause, 1988, Krause *et al.*, 1988, Demmig *et al.*, 1987). Cette augmentation du taux de désexcitations non-radiatives est interprétée comme un mode de protection de l'appareil photosynthétique. Dans le cas de nos mesures, le signal PA en présence du faisceau saturant, un indicateur du taux de dissipation thermique, n'a augmenté que d'environ 10 % dans le meilleur de nos cas. Cette valeur se révèle très inférieure aux 100 à 150 % d'augmentation observée avec des disques de feuilles de pois (Havaux, 1989). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous utilisons un second disque de feuille photoinhibé, prélevé sur la même feuille du plant complet, alors que le même disque de feuille de pois servait à la fois de témoin et de traité chez Havaux. Notre méthode prévient d'éventuels effets de dessiccation sur les propriétés optiques et thermiques de la feuille, ce qui s'est probablement produit chez le pois, biaisant les résultats.

Afin de mieux interpréter l'augmentation de l'activité du PS I, des mesures de l'EEP à 705 nm ont été effectuées. Le faisceau modulé de 705 nm est préférentiellement absorbé par le PS I (Herbert *et al.*, 1990). Ainsi, l'EEP mesuré en présence du faisceau saturant blanc reflète les intermédiaires formés pendant le transport cyclique d'électrons ($EEP_{PS\ I-cy}$, Canaani *et al.*, 1989, Herbert *et al.*, 1990, Malkin *et al.*, 1991). L' $EEP_{PS\ I-cy}$ se révèle faible chez les plantes à photosynthèse en C_3 . Chez les semis d'érable à sucre, l' $EEP_{PS\ I-cy}$, déterminé à 705 nm, augmente suite à un traitement photoinhibiteur (Tableau VIII), ce qui rejoint nos observations quant à l' $EEP_{PS\ I}$, tel que mesuré à 650 nm. Cette augmentation de l' $EEP_{PS\ I-cy}$ rejoint les conclusions de Canaani *et al.* (1989) et de Havaux et Eyletters (1991) sur la résistance de l' $EEP_{PS\ I-cy}$ aux traitements photoinhibiteurs. De plus, Havaux et Eyletters ont noté une augmentation transitoire de l' $EEP_{PS\ I-cy}$ pendant les 20 premières minutes de traitement chez le pois, que nous portons au moins à 60 min chez l'érable à sucre.

En fait, la signification physiologique du transport cyclique d'électrons autour du PS I n'est pas clairement expliquée, puisque l'utilité de la photophosphorylation cyclique l'accompagnant n'est pas encore évidente pour justifier la fixation de CO_2 chez les plantes saines. L'augmentation de l'activité du transport cyclique d'électrons autour du PS I constituerait une adaptation de la plante aux stress lumineux. Si tel est le cas, la fonction du transport cyclique d'électrons serait de protéger l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition (ou un autre stress?). Il existe quelques évidences montrant que le transport cyclique se révèle nécessaire afin de prévenir des photodommages aux chloroplastes (Ridley, 1977, Ridley et Horton, 1984). La photophosphorylation cyclique s'ensuivant permettrait de dissiper le surplus d'énergie du PS I, tout en induisant la

synthèse des molécules d'ATP requises pour les processus de réparation (Canaani *et al.*, 1989). De plus, le gradient trans-thylacoïdien de protons formé induit la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine, molécule qui serait impliquée dans l'augmentation de dissipation thermique lors de la photoinhibition (telle qu'interprétée par la hausse de l'atténuation non-photochimique de la fluorescence de la chlorophylle, Demmig *et al.*, 1987).

L'activité du PS I dépendante du PS II ($EEP_{PS\ I-II}$), mesurée en présence du faisceau saturant bleu-vert, représente l'énergie emmagasinée dans les intermédiaires de la chaîne de transport d'électrons, à la fois en amont et en aval du PS I. Fait intéressant, l' $EEP_{PS\ I-II}$ augmente d'environ 20 % suite au traitement photoinhibiteur, malgré une chute d'environ 40 % de la valeur d' $EEP_{PS\ II}$ (Tableau VIII). Ceci nous porte à croire que le flot d'électrons en provenance du PS II ne limite pas l'activité du PS I chez les feuilles traitées. Ainsi, la population de PS II serait supérieure à celle du PS I *in vivo* chez l'érable à sucre.

Outre la réduction du $NADP^+$, l'électron en provenance du PS I peut être accepté par l' O_2 *via* la réaction de Mehler. Cette photoréduction de l' O_2 peut s'avérer un mécanisme de protection important si la plante possède un bon système de piège des radicaux libres (Krause, 1988, Wu *et al.*, 1991). L'augmentation de l'activité du PS I peut ainsi être considérée comme un mode de protection de l'appareil photosynthétique.

L'activité totale du PS I mesurée à 705 nm ($EEP_{PS\ I-cy} + EEP_{PS\ I-II}$) représente environ 40 % de l' EEP_T déterminée à 650 nm. Ceci contraste avec les résultats

présentés avec l'algue rouge *Porphyra*, où les deux valeurs étaient similaires (Malkin *et al.*, 1990). Ceci nous suggère, encore, que l'activité du PS I constituerait un facteur limitant du transport d'électrons chez les semis d'érable à sucre.

Afin de vérifier le seuil de tolérance du PS I aux hautes intensités lumineuses, nous avons étudié l'effet de différentes intensités sur l'EEP_T, l'EEP_{PS I} et l'EEP_{PS II} (figure 41). A une intensité de 2500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'EEP_{PS I} est réduit d'environ 20 % suite au traitement d'une heure, alors que l'EEP_T et l'EEP_{PS II} ont chuté d'environ 50 %. Le phénomène est accentué lors d'une exposition d'une heure à 3 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, puisque des baisses de 40 %, de 65 % et de 70 % sont observées pour l'EEP_{PS I}, l'EEP_T et l'EEP_{PS II}, respectivement. En analysant soigneusement nos résultats, nous constatons que l'inhibition de l'activité du PS I se produit lorsque celle du PS II est réduite de 50 % ou plus. Bien que nécessitant plus de données, ceci suggère qu'il existe un seuil physiologique de tolérance. L'inhibition du PS I peut être due à une photodestruction des centres Fe-S et/ou du P700; le site d'action varie selon les conditions (Inoue *et al.*, 1986, 1990).

Nous avons aussi étudié l'influence de l'association du CCL II mobile avec le PS II lors du traitement photoinhibiteur. Nous avons donc expérimentalement induit l'état 1 (où le CCL II est lié au PS II) en illuminant la feuille avec un faisceau rouge lointain avant d'effectuer le traitement photoinhibiteur. Malgré l'association du CCL II avec le PS II, et le risque inhérent d'une sur-énergisation du PS II, le traitement photoinhibiteur produit des baisses de l'EEP_T et de l'EEP_{PS II} comparables à celles observées précédemment (données du Tableau X comparées à celles du Tableau VIII).

L' $EEP_{PS I}$ augmente pendant le traitement d'environ 60 %. Donc, l'association du PS II mobile avec le PS II n'induit pas de dommages additionnels à celui-ci. Cette donnée s'avère contraire à des résultats obtenus en spectroscopie de fluorescence publiés antérieurement, (Horton et Lee, 1985).

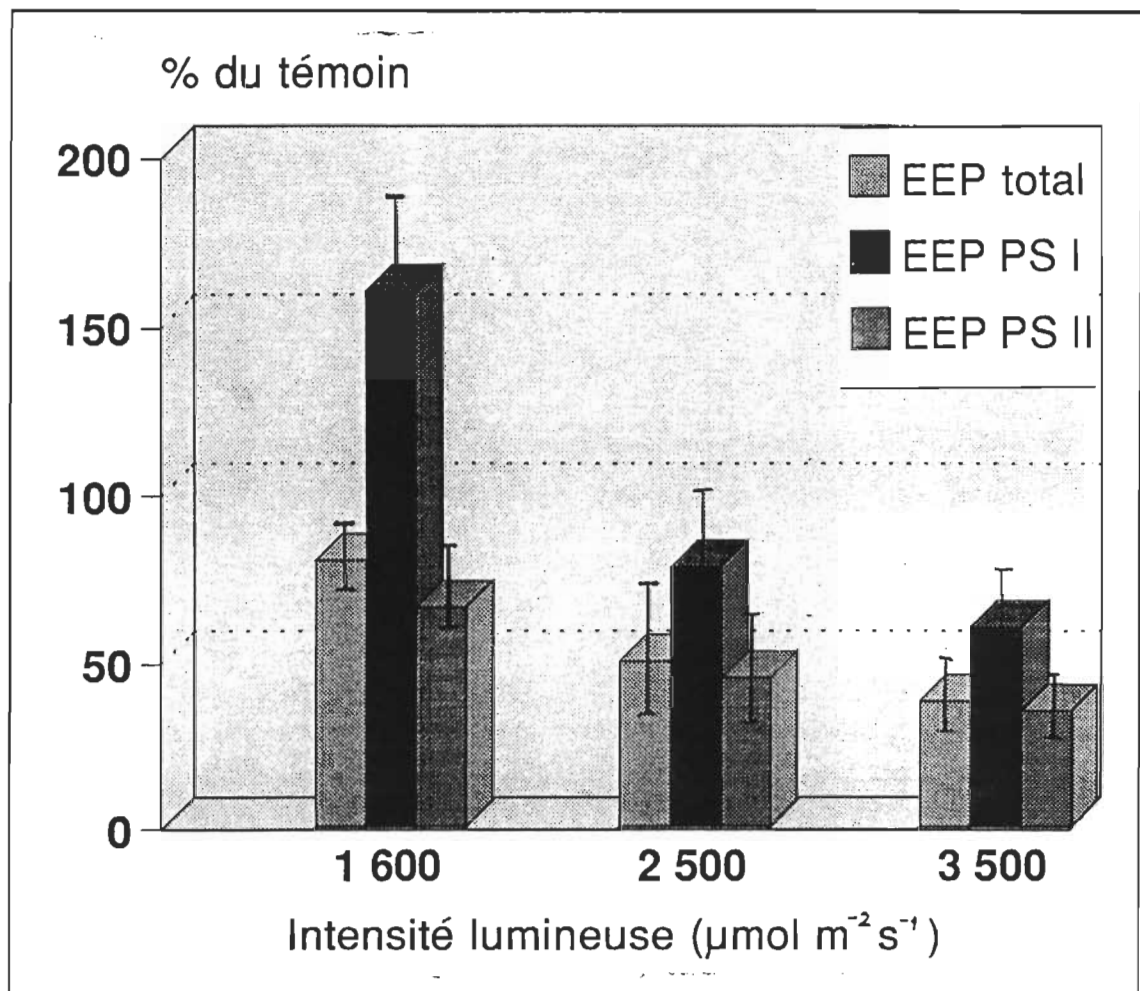


Figure 41: Effets de différentes intensités lumineuses sur l' EEP_T , l' $EEP_{PS I}$ et l' $EEP_{PS II}$ de feuilles d'érable à sucre. Les conditions sont similaires à celles de la figure 39.

Le rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ décroît lors du traitement photoinhibiteur, pour se rapprocher de valeurs obtenues dans l'état 2. Cette diminution s'avère reliée à la fois à une augmentation de l' $EEP_{PS\ I}$ et à une diminution de l' $EEP_{PS\ II}$. Si on regarde de plus près la diminution de l' $EEP_{PS\ II}$, deux causes peuvent l'occasionner: (i) la dissociation du CCL II mobile vers le PS I (Veeranjaneyulu *et al.*, 1991) et (ii) les dommages induits par le traitement lui-même (Critchley, 1988).

Tableau X
Effet d'un traitement photoinhibiteur* sur l'activité
photosynthétique de feuilles d'érable à sucre
pré-adaptées à des conditions d'état 1.

Paramètre	Témoin	Traitement
EEP_T (%)	$32,6 \pm 6,3$ **	$25,9 \pm 4,0$
$EEP_{PS\ I}$ (%)	$3,1 \pm 1,3$	$5,0 \pm 1,4$
$EEP_{PS\ II}$ (%)	$29,5 \pm 7,0$	$20,9 \pm 3,8$
$EEP_{PS\ II} / EEP_{PS\ I}$	$8,9 \pm 5,2$	$4,6 \pm 1,7$

*: Traitement: $1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ pendant 1 h.

**: Moyenne de 4 échantillons \pm écart-type.

Ainsi, il devient nécessaire d'isoler l'importance de l'effet de la perte du CCL II sur l' $EEP_{PS II}$, afin de mieux évaluer les véritables dommages causés par le traitement photoinhibiteur sur le PS II. Il est possible de vérifier ce phénomène en étudiant les variations d'emmagasinement d'énergie des deux photosystèmes pendant des transitions d'état, suite au traitement photoinhibiteur (Tableau XI).

On constate que les transitions d'état sont toujours présentes suite au traitement photoinhibiteur, mais à un niveau moindre (environ 60 % de la valeur du témoin). Ceci montre que la photoinhibition exerce un effet négatif sur ce mécanisme de protection chez le bleuet.

Tableau XI

Variation de $EEP_{PS II}/EEP_{PS I}$ de feuilles de bleuetiers
lors des transitions d'état suite à un traitement photoinhibiteur*

	État 1	État 2	% augmentation p/r à l'état 2
Témoin	15,5 ± 3,1**	5,5 ± 1,1	282 (1.00)***
Traitement	6,5 ± 2,0	3,9 ± 1,2	167 (0.59)

*: Traitement photoinhibiteur: 1 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 1 h.

**: Moyenne de 5 échantillons ± écart-type.

***: Les valeurs entre parenthèses se rapportent aux valeurs du témoin.

En conclusion, nous avons démontré dans cette section que les stress photoinhibiteurs affectaient spécifiquement le PS II. Par contre, le traitement photoinhibiteur augmente l'activité du PS I *in vivo*, autant l'activité du transport cyclique d'électrons que celle dépendante du PS II. Il existe néanmoins un seuil physiologique de tolérance du PS I au stress de hautes intensités lumineuses. Cette augmentation de l'activité du PS I peut être perçue comme un mécanisme de protection.

6.2 Sur les plantes d'ombre et de soleil

Comme je l'ai déjà mentionné dans l'introduction de ce travail, l'intensité et la qualité de la lumière incidente lors du développement influencent grandement la morphologie foliaire et les constituants de la membrane thylacoïdienne (Tableau I, page 7). Ces adaptations anatomiques mènent à une réponse différentielle de plantes soumises à une contrainte de hautes intensités lumineuses. En effet, les plantes de soleil se révèlent beaucoup plus tolérantes que les plantes d'ombre au stress photoinhibiteur (Anderson et Osmond, 1987).

Le but de cette section est d'étudier les mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition chez les plants de soleil et d'ombre. De façon particulière, je compte vérifier l'effet de cette contrainte sur les transitions d'état, sur l'activité du PS I, sur le contenu pigmentaire, qui s'avèrent autant de mécanismes potentiels de protection contre ce type de contrainte abiotique.

A l'intérieur de cette étude, une branche d'un plant de bleuetier est prélevée et coupée sous l'eau. La troisième feuille à partir de l'apex est prélevée, puis utilisée comme témoin. Le traitement photoinhibiteur est appliqué sur la quatrième feuille, toujours sur la branche, afin de minimiser les éventuels effets négatifs d'assèchement (Potvin, 1985). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre ces deux feuilles pour aucun des paramètres à l'étude lors de mesures préliminaires.

Le tableau XII présente un résumé de l'effet d'un traitement photoinhibiteur (1h, $1\ 600\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$) sur les feuilles de plants de bleuetier poussant à l'ombre et au soleil (habitat ouvert). Les résultats des feuilles traitées sont exprimés en fonction des données obtenues sur les feuilles témoins.

Le traitement photoinhibiteur affecte négativement les plants d'ombre de façon plus marquée que les plants de soleil. Cette donnée se trouve corroborée par moults rapports antérieurs (cités dans Anderson et Osmond, 1987, Anderson *et al.*, 1988). De façon particulière, le PS II se révèle plus touché que le PS I, autant chez les plants de soleil que chez les plants d'ombre. En effet, le dégagement d' O_2 , tel que mesuré par le signal PA d' O_2 (A_{O_2}), diminue d'environ 60 % chez les plants d'ombre mais très peu chez les plants de soleil. De plus, l'activité photochimique du PS II, telle que déterminée par l' $\text{EEP}_{\text{PS II}}$, s'avère beaucoup plus inhibée chez les plants d'ombre. Ceci montre que les plants acclimatés au soleil possèdent des mécanismes intrinsèques de tolérance aux stress de hautes intensités lumineuses qui s'avèrent inopérants (ou inexistantes) chez les plants acclimatés à l'ombre.

Tableau XII
Effet d'un traitement photoinhibiteur
sur des plants d'ombre et de soleil de bleuetier.

Paramètre	Effet du traitement photoinhibiteur (% du témoin)	
	Plants de soleil	Plants d'ombre
EEP_T	87 ± 16	59 ± 11
A_{O_2}	91 ± 28	38 ± 23
A_{PT}	111 ± 27	85 ± 12
A_{O_2} / A_{PT}	78 ± 43	72 ± 44
Chl <u>a</u>	115 ± 25	98 ± 18
Chl <u>b</u>	113 ± 25	99 ± 20
Caroténoïdes	117 ± 27	95 ± 15
F685 / F740	98 ± 3	72 ± 9
$EEP_{PS II}$	63 ± 20	36 ± 25
$EEP_{PS I}$	120 ± 26	66 ± 28
Transitions d'état	60 ± 10	62 ± 11

Par contre, l'activité du PS I est affectée de manière diamétralement opposée par le traitement photoinhibiteur chez les deux types de plants. Chez les plants d'ombre, l'activité du PS I est inhibée d'environ 35 %, alors qu'elle augmente d'environ 20 % chez les plants de soleil. Cette importante différence entre plants d'ombre et de soleil nous porte à croire que le PS I possède un rôle protecteur chez les plants de soleil, mais que cette qualité serait affectée chez les plants d'ombre. Comme nous l'avons vu dans la première section de ce chapitre, il existe un seuil de tolérance du PS I à la photoinhibition; ce seuil semble différent chez les plants d'ombre et de soleil, ce qui expliquerait la baisse de l' $EEP_{PS I}$ observée chez les plants d'ombre de bleuetier.

Un autre mécanisme de protection consiste en une augmentation des désexcitations non-radiatives des pigments constitutifs de la membrane thylacoïdienne, particulièrement des caroténoïdes (Demmig-Adams et Adams, 1992). Cette interprétation est basée sur une corrélation importante entre la cinétique d'atténuation non-photochimique (qui serait reliée à une hausse du taux de désexcitations non-radiatives) de la fluorescence chlorophyllienne et celle de la conversion de la violaxanthine en zeaxanthine (Demmig *et al.*, 1987). Buschmann (1987) et Havaux (1989) ont présenté des résultats en spectroscopie photoacoustique montrant une augmentation de l'émission de chaleur suite à un traitement photoinhibiteur.

Dans le cadre de ce travail, une très légère élévation de l'émission de chaleur, telle que donnée par A_{PT} , est notée chez les plants de soleil, alors qu'une diminution est observée chez les plants d'ombre (Tableau XII). L'augmentation de A_{PT} chez les plants de soleil se révèle cependant très inférieure à celle rapportée par Havaux (1989). Un

changement notable des méthodologies employées lors du traitement photoinhibiteur m'apparaît une cause fort probable de cette importante différence. En effet, cet auteur a utilisé le même disque de feuille comme témoin et lors du traitement, ce qui a pu produire un dessèchement important du disque de feuille, et une variation de propriétés physiques de transmission de chaleur de celui-ci. Pour ma part, en utilisant deux disques différents, je n'ai pas observé de variation des propriétés thermiques de la feuille, puisque la pente du graphique $\ln(A_{PT})$ en fonction de $(f_{mod})^{1/2}$ (un indicateur du coefficient de diffusion thermique (Havaux *et al.*, 1986 a) est demeurée similaire suite au traitement photoinhibiteur.

Toutefois, il se révèle intéressant de constater que la hausse du signal thermique chez les plants de soleil se conjugue à une augmentation du contenu pigmentaire lors du traitement photoinhibiteur (Tableau XII). En fait, nous n'avions pas observé de variations du contenu pigmentaire entre les troisièmes (qui seront utilisées comme témoin) et les quatrièmes (traitement) feuilles d'une même branche de bleuetier lors de mesures préliminaires. Ceci nous porte donc à croire à une légère hausse du contenu pigmentaire lors du traitement, ce qui pourrait être la cause de l'augmentation du signal photothermique.

Les transitions d'état semblent également affectées par le traitement photoinhibiteur chez les deux types de plants (Tableau XII). En effet, environ 40 % de l'amplitude de la variation du rapport $EEP_{PS\ II}/EEP_{PS\ I}$ s'avère éliminée lors des transitions d'état induites suite au traitement photoinhibiteur. Cette perte d'amplitude du rapport est néanmoins causée par deux causes différentes selon le type de plantes. Chez les plantes

d'ombre, c'est d'abord l'importante baisse de l'activité du PS II qui en est la cause alors que chez les plantes de soleil, c'est la hausse de l'activité du PS I qui s'avère responsable.

Le rapport entre l'amplitude des pics d'émission de fluorescence à 685 nm et 740 nm nous renseigne sur les échanges d'énergie se produisant entre les photosystèmes. Nous constatons une forte baisse de ce rapport chez les plantes d'ombre, alors que le rapport demeure virtuellement constant chez les plants de soleil (Tableau XII). Ceci démontre, selon Gruszecki *et al.* (1991), un réarrangement des pigments des complexes collecteurs de lumière, ce qui induirait une séparation spatiale entre les caroténoïdes et les chlorophylles.

En résumé, les plantes acclimatées à l'ombre et au soleil présentent des réponses différentes à une contrainte de hautes intensités lumineuses. Les plants de soleil s'avèrent plus tolérants, principalement grâce à l'augmentation de l'activité du PS I lors du traitement.

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

J'ai démontré à l'intérieur de ce travail, l'applicabilité de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de la photosynthèse, et plus particulièrement à la détermination des effets de la qualité et de l'intensité de l'environnement lumineux sur l'activité photosynthétique de plantes supérieures.

Dans un premier temps, j'ai analysé les différentes contributions au signal PA. La contribution d'O₂ peut s'avérer variable dans le temps selon certaines conditions expérimentales. J'ai expliqué cette variation par l'action combinée de mécanismes physiologiques de consommation d'O₂ tels la photorespiration, la respiration et la réaction de Mehler. Cette approche explicative par l'action de mécanismes dits lents s'avère une première puisque jusqu'à maintenant, les différents laboratoires travaillant en spectroscopie photoacoustique conventionnelle n'avaient démontré que des effets de mécanismes de consommation d'O₂ dits rapides, lors de l'induction photosynthétique (transition de l'obscurité à la lumière). L'apport plus spécifique de chacun de ces mécanismes pourrait probablement être étudié à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Je m'interroge néanmoins sur la faisabilité de telles mesures puisqu'il faudrait trouver une méthode d'injection des produits inhibiteurs qui n'affecte pas la structure des espaces aérifères (donc la transduction efficace du signal PA d'O₂). De plus, il aurait été intéressant d'étudier cette cinétique du signal d'O₂ sous des intensités modulées très faibles, ce qui nous aurait permis de mieux saisir l'importance de la contribution photochimique au signal d'O₂, mais le rapport signal/bruit devient une contrainte fort limitante dans ces conditions

expérimentales. Ce phénomène cinétique dans le signal PA d'O₂, et le fait que des variations physiques de la feuille affecte sûrement la signal PA d'O₂, doivent nous rendre extrêmement prudents lors de l'utilisation du signal d'O₂ comme indicateur de l'activité photosynthétique d'un échantillon.

Étant donné cette situation, je me suis attardé à étudier l'emmagasinement d'énergie photosynthétique. En infiltrant la feuille d'eau, nous éliminons la contribution d'O₂ au signal PA, ce qui nous permet de conserver les contributions thermique et d'emmagasinement d'énergie photosynthétique dans des conditions expérimentales permettant une fiabilité des mesures (rapport signal/bruit élevé). Il devient aussi possible de suivre des cinétiques d'induction thermique - et de leur contrepartie, les cinétiques d'emmagasinement d'énergie photosynthétique - et de les corréler avec l'induction photosynthétique. Des travaux ultérieurs demeurent encore à faire afin de mieux caractériser les cinétiques d'induction d'EEP et de les corréler avec celles d'oxygène, de fluorescence et de l'activité photosynthétique. De plus, l'infiltration d'eau altère les propriétés optiques des feuilles, ce qui augmente la résolution spectrale de la méthodologie photoacoustique. L'avantage de la méthodologie PA sur l'effet mirage réside dans la possibilité en SPA d'enregistrer des spectres de feuilles pubescentes. Cette méthodologie d'infiltration pourra s'avérer utile dans d'éventuelles études de la photosynthèse, puisqu'il devient possible de mettre en contact, efficacement, différents modulateurs de l'activité photosynthétique (ici j'ai utilisé le DCMU et le NaF), dans des conditions près de celles naturelles.

Au début de ce travail, il n'existait pas de méthodologie nous permettant de mesurer *in vivo* l'activité de chacun des photosystèmes à l'aide de paramètres communs. Un des objectifs majeurs de ce travail visait à développer une méthodologie photoacoustique rendant possible la mesure de l'activité des photosystèmes I et II, séparément et *in vivo*. Cet objectif a été atteint en utilisant concurremment la saturation de l'activité photosynthétique par des faisceaux de hautes intensités rouge lointain et blanc. Le faisceau saturant rouge lointain clôt les centres réactionnels des PS I, ce qui nous permet d'évaluer l' $EEP_{PS\ I}$. Le faisceau saturant blanc sert à déterminer l' EEP_T , liée à l'activité simultanée des deux photosystèmes. La soustraction de l' $EEP_{PS\ I}$ de l' EEP_T nous donne l' EEP du PS II. Cette méthode *in vivo* possède de plus l'avantage de s'avérer directe.

Cette méthodologie m'a permis de déterminer l'effet de la variation qualitative de l'environnement lumineux sur l'appareil photosynthétique, en suivant les transitions d'état se produisant *in vivo*. Les échanges d'énergie s'opérant entre les deux photosystèmes pendant ce phénomène s'avèrent égaux. Les données obtenues à cette occasion constituent une indication supplémentaire de la variation de la section efficace des photosystèmes lors des variations lumineuses. Cette mesure directe de l'activité photosynthétique s'avère également utile afin d'évaluer la distribution d'énergie entre les deux photosystèmes. Ceci m'a donc servi à étudier l'activité de chacun des deux photosystèmes dans le domaine de la radiation visible, ce qui n'avait été que très peu étudié jusqu'à ce moment, faute de moyens d'étude. La radiation rouge s'avère plus efficace afin d'induire une activité photosynthétique chez chacun des deux photosystèmes que la lumière bleue. Le PS II se révèle plus actif que le PS I de 400 à 690 nm. Au-delà de 700 nm, seule l'activité du transport cyclique autour du PS I peut être détectée. Ainsi,

la mesure des rendement quantiques de chacun des deux photosystèmes est rendue possible *in vivo* en utilisant la spectroscopie photoacoustique.

J'ai aussi utilisé cette méthodologie afin d'évaluer l'effet d'un traitement photoinhibiteur sur l'appareil photosynthétique *in vivo*. Je me suis surtout attardé sur le PS I puisqu'au début de ce travail, aucun rapport n'existait mentionnant des études *in vivo* des effets de la photoinhibition sur le PS I (un travail (Havaux et Eyelletts, 1991) est apparu entretemps, mais ne portait que sur l'activité du transport cyclique d'électrons). L'activité du PS II se révèle endommagée sélectivement, alors que l'activité du PS I augmente pendant le traitement. Cette hausse d'activité est visible à la fois dans l'activité de transport cyclique d'électrons autour du PS I que dans l'activité du PS I dépendante du PS II. Néanmoins, il semble exister un seuil à la tolérance du PS I à la radiation photoinhibitrice puisque des intensités supérieures à 650 W m^{-2} pendant 1 h réduisent son activité. Cette augmentation de l'activité du PS I peut être perçue comme un mécanisme de protection de l'appareil photosynthétique.

Comme il avait déjà été démontré antérieurement, les feuilles de plants acclimatés au soleil s'avèrent plus résistantes à un traitement photoinhibiteur donné. Cette résistance pourrait s'expliquer par une élévation de la quantité de pigments lors du traitement, et surtout, par une augmentation de l'activité du PS I, chez les plants de soleil. Les variations observées lors des transitions d'état et le taux de désexcitation non-radiative lors du traitement photoinhibiteur se révèlent similaires chez les plants de soleil et d'ombre.

A un tout autre niveau que celui d'interpréter des résultats, ce travail m'a permis de réfléchir, et de m'émerveiller, à la complexité de la nature. Afin de répondre à une contrainte (des variations de l'environnement lumineux), une quantité importante de mécanismes de protection et/ou de tolérance peuvent être impliqués, et ce, autant à des niveaux grossiers, que d'ajustements fins. C'est à ce niveau que se situe l'émerveillement: malgré les misères, les plantes ont su développer des splendeurs afin de les contrer...

CHAPITRE 8

BIBLIOGRAPHIE

Adams, M.J. (1982) "*Photoacoustic spectroscopy*". Prog. Anal. Atom. Spectroc. **5**, 153-204.

Adams, M.J. et Kirkbright, G.F. (1977) "*Analytical optoacoustic spectroscopy. III. The optoacoustic effect and thermal diffusivity*". Analyst **102**, 281-292.

Anderson, J.M. et Osmond, C.B. (1987) "*Shade-sun responses: compromises between acclimation and photoinhibition*". Dans: Photoinhibition, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., New York. 1-38.

Anderson, J.M., Chow, W.S. et Goodchild, D.J. (1988) "*Thylakoid membrane organisation in sun/shade acclimation*". Aust. J. Plant Physiol. **15**, 11-26.

Anderson, L.E. (1985) "*Light/dark modulation of enzyme activity in plants*". Dans: Advances in Botanical Research (Callow, J.A. édi.). Academic Press, New York (NY). 1-46.

Andrews, T.J. et Lorimer, G.H. (1987) "*Rubisco: structure, mechanisms and prospects for improvement*". Dans: The Biochemistry of Plants, Vol. 10. Academic Press, New York (NY). 131-218.

Aro, E.-M., Rintamaki, E., Korhonen, P. et Maenpaa, P. (1986) "*Relationship between chloroplast structure and O_2 evolution rate of leaf discs in plants from different biotypes in South Finland*". Plant Cell Environ. **9**, 87-94.

Badger, M.R. (1985) "*Photosynthetic oxygen exchange*". Annu. Rev. Plant Physiol. **36**, 27-53.

Balusabramanian, D. et Rao, C.M. (1986) "*Applications of photoacoustics to biology: some specific systems and methods*". Can. J. Phys. **64**, 1132-1135.

Barber, J. et Andersson, B. (1992) "*Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis*". Trends Biochem. Sci. **17**, 61-66.

Barber, J., Malkin, S. et Telfer, A. (1989) "*The origin of chlorophyll fluorescence in vivo and its quenching by the photosystem II reaction center*". Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B323**, 227-239.

Barényi, B. et Krause, G.H. (1985) "*Inhibition of photosynthetic reactions by light. A study with isolated spinach chloroplasts*". Planta (Berlin) **163**, 218-226.

Bassi, R. et Simpson, D. (1987) "*Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I*". Eur. J. Biochem. **163**, 221-230.

- Beauregard, M. et Popovic, R.** (1988) "Removal of 23 and 18 kdalton extrinsic polypeptides by sulfate in PSII particles". *J. Plant Physiol.* **133**, 615-619.
- Belay, A.** (1981) "An experimental investigation of inhibition of phytoplankton photosynthesis at lake surfaces". *New Phytol.* **89**, 61-74.
- Bell, A.G.** (1880) "On the production and reproduction of sound by light". *Am. J. Sci.* **20**, 305-311.
- Bell, A.G.** (1881) "Upon the production of sound by radiant energy". *Phil. Mag.* **11**, 510-528.
- Bennett, J.** (1983) "Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein". *Biochem. J.* **212**, 1-13.
- Bennett, J., Shaw, E.K. et Michel, H.** (1988) "Cytochrome *b₆f* complex is required for phosphorylation of light harvesting chlorophyll *alb* complex II in chloroplast photosynthetic membrane". *Eur. J. Biochem.* **171**, 95-101.
- Benson, A.A. et Calvin, M.** (1950) "Carbon dioxide fixation by green plants". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1**, 25-42.
- Biggins, J. et Bruce, D.** (1989) "Regulation of excitation energy transfer in organisms containing phycobilins". *Photosynth. Res.* **20**, 1-34.
- Björkman, O., Powles, S.B., Fork, D.C. et Oquist, G.** (1981) "Interactions between high irradiance and water stress on photosynthetic reactions in *Nerium oleander*". *Carn. Inst. Wash. Yearb.* **80**, 57-59.
- Björkman, O., Demmig, B. et Andrews, T.J.** (1988) "Mangrove photosynthesis: response to high-irradiance stress". *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 43-61.
- Boardman, N.K.** (1971) "Subchloroplast fragments: digitonin method". *Methods Enzymol.* **23**, 268-276.
- Bonaventura, C. et Myers, J.** (1969) "Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*". *Biochim. Biophys. Acta* **189**, 366-383.
- Boucher, F., Lavoie, L., Antippa, A. et Leblanc, R.M.** (1983) "Energy transfer in photosynthetic bacteria as examined by photoacoustic spectroscopy". *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 1117-1122.
- Boucher, F., Leblanc, R.M., Savage, S. et Beaulieu, B.** (1986) "Depth-resolved chromophore analysis of bovine retina and pigment epithelium by photoacoustic spectroscopy". *Appl. Opt.* **25**, 515-520.
- Boyer, J.S., Armond, P.A. et Sharp, R.E.** (1987) "Light stress and leaf water relations". Dans: *Photoinhibition*, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., New York (NY). 111-122.

Braslavsky, S.E. (1986) *"Photoacoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and in substances of biological interest"*. Photochem. Photobiol. **43**, 667-675.

Brettel, K., Sétif, P. et Mathis, P. (1986) *"Flash-induced absorption changes in photosystem I at low temperature: evidence that the electron acceptor A₁ is vitamin K₁"*. FEBS Lett. **203**, 220-224.

Bricker, T.M. (1990) *"The structure and function of CPa-1 and CPa-2 in photosystem II"*. Photosynth. Res. **41**, 255-276.

Buchanan, B.B. (1981) *"Photosynthetic enzyme regulation by ferredoxin/thioredoxine and the ferralaterin mechanisms"*. Dans: Photosynthesis IV, (Akoyunoglou, G. édi.). Balaban International Science Service, Philadelphia (PE). 245-256.

Budde, R.J.A. et Randall, D.D. (1990) *"Light as a signal influencing the phosphorylation status of plant proteins"*. Plant Physiol. **94**, 1501-1504.

Bults, G., Horowitz, B.A., Malkin, S. et Cahen, D. (1982 a) *"Photoacoustic measurements of photosynthetic activities in whole leaves - photochemistry and gas exchange"*. Biochim. Biophys. Acta **679**, 452-465.

Bults, G., Nordal, P.E. et Kanstad, S.O. (1982 b) *"In vivo studies of gross photosynthesis in attached leaves by means of photothermal radiometry"*. Biochim. Biophys. Acta **682**, 234-237.

Buschmann, C. (1987) *"Induction kinetics of heat emission before and after photoinhibition in cotyledons of *Raphanus sativus*"*. Photosynth. Res. **14**, 229-240.

Buschmann, C. (1989) *"Photoacoustic measurements: applications in plant science"*. Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. **323**, 423-434.

Buschmann, C. et Kocsányi, L. (1989) *"Light-induced heat production correlated with fluorescence and its quenching mechanisms"*. Photosynth. Res. **21**, 129-136.

Buschmann, C. et Prehn, H. (1981) *"In vivo studies of radiative and non-radiative de-excitation processes of pigments in *Raphanus* seedlings by photoacoustic spectroscopy"*. Photobiochem. Photobiophys. **2**, 209-215.

Buschmann, C. et Prehn, H. (1983) *"In vivo photoacoustic spectra of *Raphanus* and *Tradescantia* leaves taken at different chopping frequencies of the excitation light"*. Photobiochem. Photobiophys. **5**, 63-69.

Buschmann, C. et Prehn, H. (1988) *"Inverse yield changes of heat and fluorescence during photoinhibition of photosynthesis"*. Dans: Photoacoustic and Photothermal Phenomena, (Hess, P. et Pelzl, J. édi.). Springer-Verlag, Berlin. 523-526.

Cahen, D., Garty, H. et Caplan, S.R. (1978 a) *"Spectroscopy and energetics of the purple membrane of *Halobacterium halobium*"*. FEBS Lett. **91**, 131-134.

Cahen, D., Malkin, S. et Lerner, E.I. (1978 b) "Photoacoustic spectroscopy of chloroplast membranes: listening to photosynthesis". FEBS Lett. **91**, 339-342.

Callahan, F.E. et Cheniae, G.W. (1985) "Studies on the photoinactivation of the water-oxidizing enzyme. I. Processes limiting photoactivation in hydroxylamine-extracted leaf segments". Plant Physiol. **79**, 777-786.

Callahan, F.E., Becker, D.W. et Cheniae, G.M. (1986) "Studies on the photoinactivation of the water-oxidizing enzyme. II. Characterization of weak light photoinhibition of PS II and its light-induced recovery". Plant Physiol. **82**, 261-269.

Camm. E.L., Popovic, R., Lorrain, L., Leblanc, R.M. et Fragata, M. (1988) "Photoacoustic characterization of energy storage of photosystem 2 core-enriched particles from barley isolated with the octyl- β -D-glucopyranosyl detergent". Photosynthetica **22**, 27-32.

Campbell, W.J. et Ogren, W.L. (1990 a) "A novel role for light in the activation of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase". Plant Physiol. **92**, 110-115.

Campbell, W.J. et Ogren, W.L. (1990 b) "Electron transport through photosystem I stimulates light activation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) by rubisco activase". Plant Physiol. **94**, 479-484.

Canaani, O. (1986) "Photoacoustic detection of oxygen evolution and state 1-state 2 transitions in cyanobacteria". Biochim. Biophys. Acta **852**, 74-80.

Canaani, O. (1990) "Photoacoustic studies on the dependence of state transitions on grana stacking". Photosynth. Res. **25**, 225-232.

Canaani, O. et Malkin, S. (1984 a) "Distribution of light excitation in an intact leaf between the two photosystems of photosynthesis. Changes in absorption cross-sections following state 1-state 2 transitions". Biochim. Biophys. Acta **766**, 513-524.

Canaani, O. et Malkin, S. (1984 b) "Physiological adaptation to a newly observed low light intensity state in intact leaves, resulting in extreme imbalance in excitation energy distribution between the two photosystems". Biochim. Biophys. Acta **766**, 525-532.

Canaani, O., Cahen, D. et Malkin, S. (1982a) "Use of photoacoustic methods in probing development of the photosynthetic apparatus in greening leaves". Dans: Cell Function and Differentiation. Alan R. Liss, Inc., New York. 299-308.

Canaani, O., Cahen, D. et Malkin, S. (1982b) "Photosynthetic chromatic transitions and Emerson enhancement effects in intact leaves studied by photoacoustics". FEBS Lett. **150**, 142-145.

Canaani, O., Barber, J. et Malkin, S. (1984 a) "Evidence that phosphorylation and dephosphorylation regulate the distribution of excitation energy between the two pigment photosystems in vivo: Photoacoustic and fluorimetric study of an intact leaf". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1614-1618.

- Canaani, O., Ronen, R., Garty, J., Cahen, D., Malkin, S. et Galun, M.** (1984 b) "*Photoacoustic study of the green alga *Trebouxia* in the lichen *Ramalina duriae* in vivo*". *Photosynth. Res.* **5**, 297-306.
- Canaani, O., Motzan, Z. et Malkin, S.** (1985) "*Comparison of photosynthetic parameters of an aurea mutant (Su/su) of tobacco and the wild-type by the photoacoustic method*". *Planta (Berl.)* **164**, 480-486.
- Canaani, O., Malkin, S. et Mauzerall, D.** (1988) "*Pulsed photoacoustic detection of flash-induced oxygen evolution from intact leaves and its oscillations*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4725-4729.
- Canaani, O., Schuster, G. et Ohad, I.** (1989) "*Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: Effect on state transition, intersystem energy distribution and photosystem I cyclic electron flow*". *Photosynth. Res.* **20**, 129-146.
- Canvin, D.T., Berry, J.A., Badger, M.R., Fock, H. et Osmond, C.B.** (1980) "*Oxygen exchange in leaves in the light*". *Plant Physiol.* **66**, 302-307.
- Carpentier, R., LaRue, B. et Leblanc, R.M.** (1983a) "*Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* I. Effect of sample thickness on the photoacoustic signal*". *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 403-410.
- Carpentier, R., LaRue, B. et Leblanc, R.M.** (1983b) "*Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* II. Characterization of pigment holochroms and thermal deactivation spectrum*". *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 411-415.
- Carpentier, R., LaRue, B. et Leblanc, R.M.** (1984) "*Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* III. Detection of photosynthetic activities*". *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 534-543.
- Carpentier, R., Nakatani, H.Y. et Leblanc, R.M.** (1985) "*Photoacoustic detection of energy conversion in a photosystem II submembrane preparation from spinach*". *Biochim. Biophys. Acta* **808**, 470-473.
- Carpentier, R., Matthijs, H.C.P., Leblanc, R.M. et Hind, G.** (1986) "*Monitoring energy conversion in photosystem I of cyanobacterial heterocysts by photoacoustic spectroscopy*". *Can. J. Phys.* **64**, 1136-1138.
- Carpentier, R., Leblanc, R.M. et Mimeault, M.** (1987) "*Photoinhibition and chlorophyll photobleaching in immobilized thylakoid membranes*". *Enzyme Microb. Technol.* **9**, 489-493.
- Carpentier, R., Leblanc, R.M. et Mimeault, M.** (1988) "*Monitoring electron transfer by photoacoustic spectroscopy in native and immobilized thylakoid membranes*". *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 64-67.

- Carpentier, R., Leblanc, R.M. et Mimeault, M.** (1989) "*Photoacoustic detection of photosynthetic energy storage in photosystem II submembrane fractions*". Biochim. Biophys. Acta **975**, 370-376.
- Carpentier, R., Leblanc, R.M. et Mimeault, M.** (1990) "*On the nature of the photosynthetic energy storage monitored by photoacoustic spectroscopy*". Photosynth. Res. **23**, 313-318.
- Chapman, D.** (1975) "*Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes*". Q. Rev. Biophys. **8**, 185-235.
- Charland, M.** (1989) "*Mesure de l'activité photosynthétique chez les plantes supérieures par la spectroscopie photoacoustique*". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec. 111 pages.
- Charlebois, D.** (1992) "*Application de la spectroscopie photoacoustique à l'étude de l'effet de l'ozone et du bioxyde de soufre sur l'activité photosynthétique de l'érable à sucre: potentiel et limitations*". Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec. (en préparation).
- Chow, W.S. et Anderson, J.M.** (1987 a) "*Photosynthetic responses of *Pisum sativum* to an increase in irradiance during growth. I. Photosynthetic activities*". Aust. J. Plant Physiol. **14**, 1-8.
- Chow, W.S. et Anderson, J.M.** (1987 b) "*Photosynthetic responses of *Pisum sativum* to an increase in irradiance during growth. II. Thylakoid membrane components*". Aust. J. Plant Physiol. **14**, 9-19.
- Clark, J.B. et Lister, G.R.** (1975) "*Photosynthetic action spectra of trees. I. Comparative photosynthetic action spectra of one deciduous and four coniferous tree species as related to photorespiration and pigment complements*". Plant Physiol. **55**, 401-406.
- Cleland, R.E. et Critchley, C.** (1985) "*Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. II. Inactivation by high light of photosystem II reaction center function in isolated spinach thylakoids and O₂ evolving particles*". Photobiochem. Photobiophys. **10**, 83-92.
- Cleland, R.E., Melis, A. et Neale, P.J.** (1986) "*Mechanisms of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts*". Photosynth. Res. **9**, 79-88.
- Cleland, R.E., Critchley, C. et Melis, A.** (1987) "*Alteration of electron flow around P₆₈₀: the effect of photoinhibition*". Dans: *Progress in Photosynthesis Research*, Vol. 4, (Biggins, J., édi.). Martinus Nijhoff, Dordrecht. 27-30.
- Cogdell, R.J.** (1978) "*Carotenoids in photosynthesis*". Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci. **284**, 569-579.

Cornic, G. (1976) "Effet exercé sur l'activité photosynthétique du *Sinapis alba* L. par une inhibition temporaire de la photorespiration se déroulant dans un air sans CO_2 ". C. R. Acad. Sci. Paris **282**, 1955-1958.

Cornic, G. (1978) "La photorespiration se déroulant dans un air sans CO_2 a-t-elle une fonction?" Can. J. Bot. **56**, 2128-2137.

Critchley, C. (1981) "Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. 1. Effects of high-light intensity on chloroplast activities in cucumber adapted to low light." Plant Physiol. **67**, 1161-1165.

Critchley, C. (1988) "The molecular mechanism of photoinhibition -Facts and fiction". Aust. J. Plant Physiol. **15**, 27-41.

Critchley, C. et Smillie, R.M. (1981) "Leaf chlorophyll fluorescence as an indicator of high light stress (photoinhibition) in *Cucumis sativus* L.". Aust. J. Plant Physiol. **8**, 133-141.

Dau, H. et Canaani, O. (1990) "The involvement of LHC phosphorylation in the adaptation of higher plants to changing light intensities and some results on the regulation of LHC 2 in vivo". Dans: Current Research in Photosynthesis, Vol. IV, (Baltscheffsky, M. édi.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 325-328.

Dau, H. et Hansen, U.P. (1989) "Studies of the adaptation of intact leaves to changing light intensities by a kinetic analysis of chlorophyll fluorescence and oxygen evolution as measured by the photoacoustic signal". Photosynth. Res, **20**, 59-83.

Dau, H. et Hansen, U.P. (1990) "A study of the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic spectroscopy". Photosynth. Res. **25**, 269-278.

Daubenmire, R. (1968) Plant Communities: A Textbook of Plant Synecology. Harper & Row, Publishers, New York. 300 pages.

De la Torre, W.R. et Burkey, K.O. (1990) "Acclimation of barley to changes in light intensity: photosynthetic electron transport activity and components". Photosynth. Res. **24**, 127-136.

Demmig-Adams, B. et Adams, W.W. III (1992) "Photoprotection and other responses of plants to high light stress". Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **43**, 599-626.

Demmig, B., Winter, K., Kruger, A. et Czygan, F.C. (1987) "Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy". Plant Physiol. **84**, 218-224.

Demmig-Adams, B., Adams, W.W. III, Czygan, F.-C., Schreiber, U. et Lange, O.L. (1990) "Differences in the capacity for radiationless energy dissipation in the photochemical apparatus of green and blue-green algal lichens with differences in carotenoid composition". Planta (Berl.) **180**, 582-589.

- Désormeaux, A. et Leblanc, R.M. (1985) "*Electronic and photoacoustic spectroscopy of chlorophyll a in monolayer and multilayer arrays*". Thin Solid Films **132**, 91-99.
- Devlin, R.M. (1975) Plant Physiology, 3rd edition. D. Van Nostrand Company, Toronto, 600 pages.
- Dienstbier, M., Il'Ina, M.D., Borisov, A.Y., Ambrož, M. et Vacek, K. (1984) "*Radiative and non-radiative losses of radiant energy in chloroplasts and pigment-protein complexes studied by fluorescence and photoacoustic techniques*". Photosynthetica **18**, 512-521.
- Droppa, M. et Horvath, G. (1990) "*The role of copper in photosynthesis*". CRC Crit. Rev. Plant Sci. **9**, 111-123.
- Dubetz, S. (1969) "*An unusual photonastism induced by drought in Phaseolus vulgaris*". Can. J. Bot. **47**, 1640-1641.
- Ducharme, D. (1979) "*Mise au point d'un spectromètre photoacoustique à simple faisceau*". Mémoire de maîtrise, Université Laval, Québec. 89 pages.
- Ducharme, D., Tessier, A. et Leblanc, R.M. (1979) "*Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter*". Rev. Scient. Instrum., **50**, 1461-1462.
- Dziri, L. (1992) "*Effet à long terme de doses d'ozone sur l'érable à sucre*". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières. (en préparation).
- Eckert, H.-J., Geiken, B., Bernarding, J., Eichler, H.-J. et Renger, G. (1991) "*Two sites of photoinhibition of the electron transfer in oxygen evolving and Tris-treated PS II membrane fragments from spinach*". Photosynth. Res. **27**, 97-108.
- Ehleringer, J. et Forseth, I. (1980) "*Solar tracking by plants*". Science, **210**, 1094-1098.
- Ellis, J.R. (1979) "*The most abundant protein in the world*". Trends Biochem. Sci. **4**, 241-244.
- Elstner, E.F. (1979) "*Oxygen activation and superoxide dismutase in chloroplasts*". Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Photosynthesis II, (Gibbs, M. et Latzko, E. édi.), Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin. 410-415.
- Elstner, E.F. (1982) "*Oxygen activation and oxygen toxicity*". Annu. Rev. Plant Physiol. **33**, 73-96.
- Elstner, E.F. (1987) "*Metabolism of activated oxygen species*". Dans: The Biochemistry of Plants, Vol. 11. Academic Press, Inc., New York (NY). 253-315.
- Emerson, R. et Lewis, C.M. (1943) "*The dependence of the quantum yield of Chlorella photosynthesis on wavelength of light*". Am. J. Bot. **30**, 165-178.

- Farringer, E.L., O'Hara, E.P. et Moore, T.A. (1985) "A photoacoustic study of morphological changes occurring in plant tissue cultures accompanying differentiation". *Photochem. Photobiol.* **41**, 417-419.
- Fork, D.C. et Herbert, S.K. (1991) "A gas-permeable photoacoustic cell". *Photosynth. Res.* **27**, 151-156.
- Fork, D.C. et Satoh, K. (1986) "The control by state transitions of the distribution of excitation energy in photosynthesis". *Annu. Rev. Plant Physiol.* **37**, 335-361.
- Fork, D.C., Herbert, S.K. et Malkin, S. (1991) "Light energy distribution in the brown algae *Macrocystis pyrifera* (Giant kelp)". *Plant Physiol.* **95**, 731-739.
- Forti, G. (1987) "Energy conversion in higher plants and algae". Dans: *Photosynthesis*, (Amesz, J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 1-20.
- Frackowiak, D., Hotchandani, S. et Leblanc, R.M. (1985a) "Photoacoustic spectra of phycobiliproteins and chlorophyllin in isotropic and anisotropic polyvinylalcohol films". *Photochem. Photobiol.* **42**, 559-565.
- Frackowiak, D., Hotchandani, S., Bialek-Bylka, G. et Leblanc, R.M. (1985b) "Polarized photoacoustic spectra of phycoerythrin and phycocyanin in anisotropic polymer films". *Photochem. Photobiol.* **42**, 567-572.
- Frackowiak, D., Lorrain, L., Wrobel, D. et Leblanc, R.M. (1985c) "Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented in polyvinyl alcohol films". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **126**, 254-261.
- Fragata, M., Popovic, R., Camm, E.L. et Leblanc, R.M. (1987) "Pheophytin-mediated energy storage of photosystem II particles detected by photoacoustic spectroscopy". *Photosynth. Res.* **14**, 71-80.
- Galland, J. (1990) "Purification des lipides du chloroplaste par chromatographie liquide à haute performance et études spectroscopiques de mélanges chlorophylle/lipides à l'état monomoléculaire". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières. Trois-Rivières. 226 pages.
- Gamon, J.A. et Pearcy, R.W. (1989) "Leaf movement, stress avoidance and photosynthesis in *Vitis californica*". *Oecologia (Berl.)* **79**, 475-481.
- Gausman, H.W., Allen, W.A. et Escobar, D.E. (1974) "Refractive index of plant cell walls". *Appl. Opt.* **13**, 109-111.
- Ghanotakis, D.F. et Yocum, C.F. (1990) "Photosystem II and the oxygen-evolving mechanism". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **41**, 255-276.
- Girault, A. et Galmiche, J.M. (1974) "Restoration by silicic acid of DCMU-inhibited photoreactions in spinach chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta* **333**, 314-319.

- Goedheer, J.C.** (1966) "*Visible absorption and fluorescence of chlorophyll and its aggregates in solution*". Dans: *The Chlorophylls*, (Vernon, L.P. et Seely, G.R. édi.). Academic Press, New York (NY). 174-184.
- Golbeck, J.H.** (1987) "*Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex*". *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 167-204.
- Goodwin, T.W.** (1980) *The Biochemistry of Carotenoids*. Chapman and Hall, London (UK).
- Goulet, D.** (1983) "*Spectroscopie photoacoustique de différents types d'hémoglobine et quelques applications biomédicales*". Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières. 154 pages.
- Govindjee et Wasielewski, M.R.** (1989) "*Photosystem II: From a femtosecond to a millisecond*". Dans: *Photosynthesis*, (Briggs, W.R. édi.). Alan R. Liss, Inc., New York (NY). 71-103.
- Greenbaum, N.L. et Mauzerall, D.** (1991) "*Effect of irradiance level on distribution of chlorophylls between PS II and PS I as determined from optical cross-sections*". *Biochim. Biophys. Acta* **1057**, 195-207.
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Canaani, O., Malkin, S., Mattoo, A.K. et Edelman, M.** (1989) "*Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6617-6620.
- Greer, D.H.** (1988) "*Effect of temperature on photoinhibition and recovery in *Actinidia deliciosa**". *Aust. J. Plant Physiol.* **15**, 195-205.
- Greer, D.H., Berry, J.A. et Björkman, O.** (1986) "*Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery*". *Planta (Berl.)* **168**, 253-260.
- Gruszecki, W., Veeranjaneyulu, K., Zelent, B. et Leblanc, R.M.** (1991) "*Energy transfer process during senescence: fluorescence and photoacoustic studies of intact pea leaves*". *Biochim. Biophys. Acta* **1056**, 173-180.
- Hanson, H.C.** (1917) "*Leaf-structure as related to environment*". *Am. J. Bot.* **4**, 533-560.
- Hansson, O. et Wydrzynski, T.** (1990) "*Current perceptions of photosystem II*". *Photosynth. Res.* **23**, 131-162.
- Harshbarger, W.R. et Robin, M.G.** (1973) "*The opto-acoustic effect: revival of an old technique for molecular spectroscopy*". *Acc. Chem. Res.* **6**, 329-334.

Harvey, G.W. et Bishop, N.I. (1978) "*Photolability of photosynthesis in two separate mutants of *Schenedesmus obliquus*. Preferential inactivation of photosystem I*". Plant Physiol. **62**, 330-336.

Hasegawa, K., Sakoda, M. et Bruinsma, J. (1989) "*Revision of the theory of phototropism in plants: a new interpretation of a classical experiment*". Planta (Berl.), **178**, 540-544.

Hatch, M.D. (1987) "*C₄ photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure*". Biochim. Biophys. Acta **895**, 81-106.

Havaux, M. (1988) "*Induction of photosynthesis in intact leaves under normal and stressing conditions followed simultaneously by transients in chlorophyll fluorescence and photoacoustically monitored O₂ evolution*". Plant Physiol. Biochem. **26**, 695-704.

Havaux, M. (1989 a) "*Photoacoustic characteristics of leaves of atrazine-resistant weed mutant*". Photosynth. Res. **21**, 51-59.

Havaux, M. (1989 b) "*Increased thermal deactivation of excited pigments in pea leaves subjected to photoinhibitory treatments*". Plant Physiol. **89**, 286-292.

Havaux, M. (1990 a) "*Photoacoustic study of the photochemical energy conversion in *Epilobium* plants grown under very low light conditions*". Environ. Exp. Bot. **30**, 101-109.

Havaux, M. (1990 b) "*Energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence and thermal energy dissipation in intact leaves during induction of photosynthesis*". Photochem. Photobiol. **51**, 481-486.

Havaux, M. et Eyletters, M. (1991) "*Is the in vivo photosystem I resistant to photoinhibition? An answer from photoacoustic and far-red absorbance measurements in intact leaves*". Z. Naturforsch. **46C**, 1038-1044.

Havaux, M., Canaani, O. et Malkin, S. (1986 a) "*Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustics and related methods I. Probing the photoacoustic method as an indicator for water stress in vivo*". Plant Physiol. **82**, 827-833.

Havaux, M., Canaani, O. et Malkin, S. (1986 b) "*Photosynthetic responses of leaves to water stress, expressed by photoacoustics and related methods II. The effect of rapid drought on the electron transport and the relative activities of the two photosystems*". Plant Physiol **82**, 827-833.

Havaux, M., Canaani, O. et Malkin, S. (1987 a) "*Rapid screening for heat tolerance in *Phaseolus* species using the photoacoustic technique*". Plant Sci. **48**, 143-149.

Havaux, M., Canaani, O. et Malkin, S. (1987 b) "*Inhibition of photosynthetic activities under slow water stress measured in vivo by the photoacoustic method*". Physiol. Plant. **70**, 503-510.

- Havaux, M., Canaani, O. et Malkin, S. (1987 c) "*Oxygen uptake by tobacco leaves after heat shock*". *Plant Cell Environ.* **10**, 677-683.
- Havaux, M., Lorrain, L. et Leblanc, R.M. (1989) "*In vivo measurement of spectroscopic and photochemical properties of intact leaves studied by the "mirage effect"*". *FEBS Lett.* **250**, 395-399.
- Havaux, M., Gruszecki, W.I., Dupont, I. et Leblanc, R.M. (1991) "*Increased heat emission and its relationship to the xanthophyll cycle in pea leaves exposed to strong light stress*". *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **8**, 361-370.
- Heller, R. (1978) Abrégé de physiologie végétale, tome 2. Développement. Masson, Paris. 215 p.
- Hémon, L. (1949) Maria Chapdelaine. Presses de la Cité, Montréal. 138 pages.
- Herbert, S.K. (1990) "*Photoinhibition resistance in the red alga Porphyra perforata. The role of photoinhibition repair*". *Plant Physiol.* **92**, 514-519.
- Herbert, S.K., Fork, D.C. et Malkin, S. (1990) "*Photoacoustic measurements in vivo of energy storage by cyclic electron flow in algae and higher plants*". *Plant Physiol.* **94**, 926-934.
- Horton, P. et Lee, P. (1985) "*Phosphorylation of chloroplast membrane proteins partially protects against photoinhibition*". *Planta (Berl.)* **165**, 37-45.
- Inada, K. (1976) "*Action spectra for photosynthesis in higher plants*". *Plant Cell Physiol.* **17**, 355-365.
- Inoue, K., Sakurai, H. et Hiyama, T. (1986) "*Photoinactivation sites of photosystem I in isolated chloroplasts*". *Plant Cell Physiol.* **27**, 961-968.
- Inoue, K., Fujii, T., Yokoyama, E.I., Kusumoto, N. et Sakurai, H. (1990) "*The sites of photoinhibition around photosystem I in chloroplasts*". Dans: Current Research in Photosynthesis, Vol. II, (Baltscheffsky, M. édi.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 655-658.
- Inoue, Y., Watanabe, A. et Shibata, K. (1979) "*Transient variation of photoacoustic signal from leaves accompanying photosynthesis*". *FEBS Lett.* **101**, 321-323.
- Jabben, M. et Holmes, M.G. (1983) "*Phytochrome in light-grown plants*". Dans: Encyclopedia of Plant Physiology V16B, (Hauptft, W. édi.). Springer-Verlag, Berlin. 704-722.
- Jabben, M. et Schaffner, K. (1985) "*Pulsed-laser induced opto-acoustic spectroscopy of intact leaves*". *Biochim. Biophys. Acta* **809**, 445-451.

- Jansen, M.A.K., Shaaltiel, Y., Kazzes, D., Canaani, O., Malkin, S. et Gressel, J. (1989) "Increased tolerance to photoinhibitory light in paraquat-resistant *Conyza bonariensis* measured by photoacoustic spectroscopy and $^{14}\text{CO}_2$ -fixation". *Plant Physiol.* **91**, 1171-1178.
- Jensen, W.A. et Salisbury, F.B. (1984) "Coordination of development with days and seasons". Dans: *Botany*, 2nd edition. Wadsworth, Inc., Belmont (CA). 322-346.
- Jiao, J.J. et Chollet, R. (1992) "Light activation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity is inhibited by mesophyll and bundle sheath-directed photosynthesis inhibitors". *Plant Physiol.* **98**, 152-156.
- Joliot, P. (1963) "Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa* II. Cinétique d'émission d'oxygène et fluorescence pendant la phase initiale d'illumination". *J. Chem. Phys.* **58**, 584-595.
- Joliot, P., Joliot, A. et Kok, B. (1968) "Analysis of the interactions between the two photosystems in isolated chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta* **153**, 635-652.
- Jones, L.W. et Kok, B. (1966 a) "Photoinhibition of chloroplasts reactions. I. Kinetics and action spectra". *Plant Physiol.* **41**, 1037-1043.
- Jones, L.W. et Kok, B. (1966 b) "Photoinhibition of chloroplasts reactions. II. Multiple effects". *Plant Physiol.* **41**, 1044-1051.
- Junge, W. (1989) "Protons, the thylakoid membrane, and the chloroplast ATP synthase". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **574**, 268-286.
- Jursinic, P. et Dennenberg, R. (1989) "Measurement of stoichiometry of photosystem I to photosystem II reaction centers". *Photosynth. Res.* **21**, 197-200.
- Kannangara, C.G., Gough, S.P., Hansen, B., Rasmussen, J.N. et Simpson, D.J. (1977) "A homogenizer with replaceable razor blades for bulk isolation of active barley plastids". *Carlsberg Res. Commun.* **42**, 431-439.
- Kanstad, S.O., Cahen, D. et Malkin, S. (1983) "Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photothermal radiometry and photoacoustics". *Biochim. Biophys. Acta* **722**, 182-189.
- Katoh, S. et Yamagishi, A. (1984) "Parallel inductive kinetics of fluorescence and photoacoustic signal in dark-adapted thalli of *Bryopsis maxima*". *Biochim. Biophys. Acta* **767**, 185-191.
- Kok, B., Forbush, B. et McGloin, M.P. (1970) "Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution. I. A linear four step mechanism". *Photochem. Photobiol.* **11**, 457-475.

- Kolbowski, J., Reising, H. et Schreiber, U. (1990) "Computer-controlled pulse modulation system for analysis of photoacoustic signals in the time domain". *Photosynth. Res.* **25**, 309-316.
- Krause, G.H. (1988) "Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism". *Physiol. Plant.* **74**, 566-574.
- Krause, G.H. et Weis, E. (1991) "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 313-349.
- Krause, G.H., Kirk, M., Heber, U. et Osmond, C.B. (1978) " O_2 -dependent inhibition of photosynthetic capacity in intact isolated chloroplasts and isolated cells from spinach leaves illuminated in the absence of CO_2 ". *Planta (Berl.)* **142**, 229-233.
- Krause, G.H., Koster, S. et Wong, S.C. (1985) "Photoinhibition of photosynthesis under anaerobic conditions studied in leaves and chloroplasts of *Spinacia oleracea* L.". *Planta (Berl.)* **165**, 430-438.
- Krause, G.H., Laasch, H. et Weis, E. (1988) "Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy-dependent fluorescence quenching". *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 445-452.
- Krinsky, N.I. (1978) "Non-photosynthetic functions of carotenoids". *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **284**, 581-590.
- Krugman, S.L., Stein, W.I. et Schmitt, D.M. (1974) "Seed Biology". Dans: Seeds of Woody Plants in the United States. Forest Service, U.S. Department of Agriculture, Washington (D.C.). 5-35.
- Kyle, D.J. (1985) "Light-induced turn-over of the 32000 dalton Q_B -protein". Dans: Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus, (Steinback, K.E., Bonitz, S., Arntzen, C.J. et Bogorad, L. édi.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY). 33-38.
- Kyle, D.J. (1987) "The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II". Dans: Photoinhibition, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J., édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 197-226.
- Kyle, D.J. et Ohad, I. (1986) "The mechanism of photoinhibition in higher plants and green algae". Dans Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Photosynthesis III, (Staehelin, L.A. et Arntzen, C.J. édi.). Vol. 19, Springer-Verlag, Berlin. 468-475.
- Kyle, D.J., Ohad, I. et Arntzen, C.J. (1984) "Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4070-4074.
- Lasser-Ross, N., Malkin, S. et Cahen, D. (1980) "Photoacoustic detection of photosynthetic activities in isolated broken chloroplasts". *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 330-341.

- Lavergne, J.** (1989) "*Mitochondrial responses to intracellular pulses of photosynthetic oxygen*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 8769-8772.
- Lee, W.-J. et Whitmarsh, J.** (1989) "*Photosynthetic apparatus of pea thylakoid membranes. Response to growth light intensity*". Plant Physiol. **89**, 932-940.
- Lehninger, A.L.** (1981) Biochimie, 2ième édition. Flammarion Sciences, Paris. 1088 pages.
- Lichtenthaler, H.K.** (1987) "*Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*". Methods Enzymol. **148**, 350-382.
- Lichtenthaler, H.K. et U. Rinderle** (1988) "*The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants*". Crit. Rev. Plant Sci. **19**, 29-85.
- Lima, C.A.S., Vargas, H., Cesar, C.L., Lima, M.B.S., Prioli, L.M. et Da Silva, W.J.** (1985) "*Non-destructive assessment of chlorophyll-deficient mutants of maize (Zea mays L.) by photoacoustic spectroscopy*". Plant Sci. **38**, 47-51.
- Long, S.P.** (1983) "*C₄ photosynthesis at low temperatures*". Plant Cell Physiol. **6**, 345-363.
- Lorrain, L., Havaux, M., Tessier, A. et Leblanc, R.M.** (1990) "*Photothermal deflection spectroscopy of photosynthetic pigments in vivo and in vitro*". Photochem. Photobiol. **51**, 491-496.
- Ludlow, M.M.** (1987) "*Light stress at high temperature*". Dans: Photoinhibition, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 89-110.
- Ludlow, M.M. et Björkman, O.** (1983) "*Paraheliotropic leaf movement as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions*". Carn. Inst. Wash. Yearbook **82**, 75-77.
- Ludlow, M.M. et Björkman, O.** (1984) "*Paraheliotropic leaf movement in Siratro as a protective mechanism against drought-induced damage to primary photosynthetic reactions: damages by excessive light and heat*". Planta (Berl.), **161**, 505-518.
- Lüscher, E.** (1981) "*Photoacoustic effect in condensed matter- Historical development*". Dans: Photoacoustic Effect: Principles and Applications. Friedr. Vieweg & Sohn, Wiesbaden (Allemagne). 1-27.
- Malkin, R.** (1988) "*Structure-function studies of photosynthetic cytochrome b-c₁ and b₆-f complexes*". Dans: ISI Atlas of Science: Biochemistry. ISI Inc., New York (NY). 57-64.
- Malkin, S.** (1987) "*Fast photoacoustic transients from dark-adapted leaves: oxygen evolution and uptake pulses during photosynthetic induction - a phenomenology record*". Planta (Berl.) **171**, 65-72.

- Malkin, S. et Cahen, D.** (1979) *"Photoacoustic spectroscopy and radiant energy conversion: theory of the effect with special emphasis on photosynthesis"*. Photochem. Photobiol. **29**, 803-813.
- Malkin, S. et Cahen, D.** (1981) *"Dependence of photoacoustic signal on optical absorption coefficient in optically dense liquids"*. Anal. Chem. **53**, 1426-1432.
- Malkin, S. et Kok, B.** (1966) *"Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts. I. Number of components involved in the reaction and quantum yields"*. Biochim. Biophys. Acta **126**, 433-442.
- Malkin, S., Canaani, O. et Havaux, M.** (1986 a) *"Analysis of Emerson enhancement under conditions where photosystem II is inhibited - are the two photosystems indeed separated"*. Photosynth. Res. **10**, 291-296.
- Malkin, S., Morgan, C.L. et Austin, R.B.** (1986 b) *"Estimation of the light distribution between photosystems I and II in intact wheat leaves by fluorescence and photoacoustic measurements"*. Photosynth. Res. **7**, 257-267.
- Malkin, S., Telfer, A. et Barber, J.** (1986 c) *"Quantitative analysis of state 1 - state 2 transitions in intact leaves using modulated fluorimetry - evidence for changes in the absorption cross-section of the two photosystems during state transitions"*. Biochim. Biophys. Acta **848**, 48-57.
- Malkin, S., Herbert, S.K. et Fork, D.C.** (1990) *"Light distribution, transfer and utilization in the marine red alga Porphyra perforata from photoacoustic energy-storage measurements"*. Biochim. Biophys. Acta **1016**, 177-186.
- Malkin, S., Schreiber, U., Jansen, M., Canaani, O., Shalgi, E. et Cahen, D.** (1991) *"The use of photothermal radiometry in assessing leaf photosynthesis: i. General properties and correlation of energy storage to P_{700} redox state"*. Photosynth. Res. **29**, 87-96.
- Malkin, S., Charland, M. et Leblanc, R.M.** (1992) *"A photoacoustic study of water infiltrated leaves"*. Photosynth. Res. (sous presse).
- Marie-Victorin, frère, É.C.** (1964) *Flore laurentienne*, 2^{ème} édition. Les Presses de l'Université de Montréal: Montréal. 925 pages.
- Mathis, J.M. et Burkey, K.O.** (1989) *"Light intensity regulates the accumulation of the major light-harvesting chlorophyll-protein in greening seedlings"*. Plant Physiol. **90**, 560-566.
- Mathis, P. et Rutherford, A.W.** (1987) *"The primary reactions of photosystems I and II of algae and higher plants"*. Dans: *Photosynthesis*, (Amesz, J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 63-96.

- Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marderm, J.B. et Edelman, M.** (1984) "*Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1380-1384.
- Mauzerall, D.C.** (1990) "*Determination of oxygen emission and uptake in leaves by pulsed, time resolved photoacoustics*". Plant Physiol. **94**, 278-283.
- Mayfield, S.P., Nelson, T. et Taylor, W.C.** (1986) "*The fate of chloroplast proteins during photooxidation in carotenoid-deficient maize leaves*". Plant Physiol. **82**, 760-764.
- McCree, K.J.** (1971) "*The action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants*". Agric. Meteorol. **9**, 191-216.
- Mikulska, M., Poskuta, J.W. et Maleszewski, S.** (1988) "*Effect of long-term action of high concentrations of oxygen on photosynthetic apparatus in French bean leaves 2. CO₂ exchange, enzyme activities and level of ribulose-1-5-bisphosphate in leaves*". Photosynthetica **22**, 383-387.
- Mitchell, R., Spillman, A. et Haehnel, W.** (1990) "*Plastoquinol diffusion in linear photosynthetic electron transport*". Biophys. J. **58**, 1011-1024.
- Moore, T.A., Benin, D. et Tom, R.** (1983) "*Photoacoustic measurement of photophysical properties of photosynthetic pigments: porphyrins and chlorophylls*". J. Phys. (Coll. C6) **44**, 351-353.
- Moss, R.A. et Loomis, W.E.** (1952) "*Absorption spectra of leaves 1. The visible spectrum*". Plant Physiol. **27**, 370-391.
- Murata, N.** (1969) "*Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in Porphyridium cruentum*". Biochim. Biophys. Acta **172**, 242-251.
- Murata, N. et Miyao, M.** (1989) "*Photosystem II and oxygen evolution*". Dans: Photosynthesis, (Briggs, W.R. édi.). Alan R. Liss Inc., New York (NY). 59-70.
- Murata, N. et Satoh, K.** (1986) "*Absorption and fluorescence emission by intact cells, chloroplasts, and chlorophyll-protein complexes*". Dans: Light Emission by Plants and Bacteria, (Govindjee, Amesz, J. et Fork, D.C. édi.). Academic Press, Inc., New York (NY). pp. 137-159.
- Myers, J. et Burr, G.O.** (1940) "*Studies on photosynthesis. Some effects of light of high intensity on Chlorella*". J. Gen. Physiol. **24**, 45-58.
- Nagel, E.M., Buschmann, C. et Lichtenthaler, H.K.** (1987) "*Photoacoustic spectra of needles as an indicator of the activity of the photosynthetic apparatus of healthy and damaged conifers*". Physiol. Plant. **70**, 427-437.

- Neale, P.J. (1987) "*Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment*". Dans: *Photoinhibition*, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 39-65.
- Nedbal, L., Setlikova, E., Masojidek, J. et Setlik, I. (1986) "*The nature of photoinhibition in isolated thylakoids*". Biochim. Biophys. Acta **848**, 108-119.
- Nelson, N. (1987) "*Structure and function of protein complexes in the photosynthetic membrane*". Dans: *Photosynthesis* (Amesz, J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 213-231.
- Nitsch, C., Braslavsky, S. et Shatz, G. (1988) "*Laser-induced optoacoustic calorimetry of primary processes in isolated photosystem I and photosystem II particles*". Biochim. Biophys. Acta **934**, 201-212.
- N'soukpoé-Kossi, C.N. et Leblanc, R.M. (1988) "*Photoacoustic spectroscopy in biomedical sciences*". Dans: *Photosensitisation* (Moreno, G. et al. édi.). NATO ASI Series, Vol. H15. Springer-Verlag, Berlin. 81-91.
- Ogren, E. et Oquist, G. (1984) "*Photoinhibition of photosynthesis in Lemna gibba as induced by the interaction between light and temperature. I. Photosynthetic electron transport*". Physiol. Plant. **62**, 187-192.
- Ogren, E., Oquist, G. et Hallgren, J.-E. (1984) "*Photoinhibition of photosynthesis in Lemna gibba as induced by the interaction between light and temperature. I. Photosynthesis in vivo*". Physiol. Plant. **62**, 181-186.
- Ogren, W.L. (1984) "*Photorespiration: pathways, regulation, and modification*". Annu. Rev. Plant Physiol. **35**, 415-442.
- Ohad, I., Kyle, D.J. et Hirschberg, J. (1985) "*Light-dependent degradation of the Q_B -protein in isolated pea thylakoids*". EMBO J. **4**, 1655-1659.
- O'Hara, E.P., Tom, R.D. et Moore, T.A. (1983) "*Determination of the in vivo absorption and photosynthetic properties of the lichen Acarospora schleicheri using photoacoustic spectroscopy*". Photochem. Photobiol. **38**, 709-715.
- O'Keefe, D.P. (1989) "*Structure and function of the chloroplast b_6-f complex*". Photosynth. Res. **17**, 189-216.
- Olson, J.M. et Pierson, B.K. (1986) "*Photosynthesis 3.5 thousand million years ago*". Photosynth. Res. **9**, 251-259.
- Oquist, G., Greer, D.H. et Ogren, E. (1987) "*Light stress at low temperature*". Dans: *Photoinhibition*, (Kyle, D.J., Osmond, C.B. et Arntzen, C.J. édi.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 67-88.
- Ort, D.R. et Good, N.E. (1988) "*Textbooks ignore photosystem II-dependent ATP formation: is the Z scheme to blame?*". Trends Biochem. Sci. **13**, 467-470.

- Ortner, P.B. et Rosencwaig, A. (1977) "*Photoacoustic spectroscopic analysis of marine phytoplankton*". *Hydrobiologia* **56**, 3-6.
- Osmond, C.B. (1981) "*Photorespiration and photoinhibition. Some implications for the energetics of photosynthesis*". *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 77-98.
- Owens, T.G., Carpentier, R. et Leblanc, R.M. (1990) "*Detection of photosynthetic energy storage in a photosystem I reaction center preparation by photoacoustic spectroscopy*". *Photosynth. Res.* **24**, 201-208.
- Paerl, H.W. (1984) "*Cyanobacterial carotenoids: their roles in maintaining optimal photosynthetic production among aquatic bloom forming genera*". *Oecologia (Berl.)* **61**, 143-149.
- Popovic, R., Beauregard, M. et Leblanc, R.M. (1987) "*Study of energy storage processes in bundle sheath cells of Zea mays*". *Plant Physiol.* **84**, 1437-1441.
- Potvin, C. (1985) "*Effect of leaf detachment on chlorophyll fluorescence during chilling experiments*". *Plant Physiol.* **78**, 883-886.
- Poulet, P., Cahen, D. et Malkin, S. (1983) "*Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements*". *Biochim. Biophys. Acta* **724**, 433-446.
- Powles, S.B. (1984) "*Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light*". *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **35**, 14-44.
- Powles, S.B. et Björkman, O. (1982) "*Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll fluorescence at 77 K in intact leaves and in chloroplast membranes of Nerium oleander*". *Planta (Berl.)* **156**, 97-107.
- Powles, S.B., Osmond, C.B. et Thorne, S.W. (1979) "*Photoinhibition of intact attached leaves of C₃ plants illuminated in the absence of both carbon dioxide and of photorespiration*". *Plant Physiol.* **64**, 982-988.
- Powles, S.B., Chapman, K.S.R. et Osmond, C.B. (1980) "*Photoinhibition of intact attached leaves of C₄ plants: dependence on CO₂ and O₂ partial pressure*". *Aust. J. Plant Physiol.* **7**, 737-747.
- Preece, W.H. (1881) "*On the conversion of radiant energy into sonorous vibrations*". *Proc. R. Soc. London* **31**, 505-520.
- Radmer, R.J. et Kok, B. (1976) "*Photoreduction of O₂ primes and replaces CO₂ assimilation*". *Plant Physiol.* **58**, 336-340.
- Radmer, R.J. et Kok, B. (1977) "*Light conversion efficiency in photosynthesis*". Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Photosynthesis I, (Trebst, A. et Avron, M. édi.). Vol. I. Springer-Verlag, Berlin. pp. 125-135.

- Rawn, D.J.** (1989) Biochemistry. Patterson Publishers, Burlington (NC). 1105 pages.
- Rayleigh, (Lord)** (1881) "The photophone". *Nature* **23**, 274-279.
- Reisman, S. et Ohad, I.** (1986) "Light dependent degradation of the thylakoid 32 kD Q_B protein in isolated chloroplast membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*". *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 51-69.
- Reisman, S., Michels, A. et Ohad, I.** (1986) "Lack of recovery from photoinhibition in a temperature-sensitive *Chlamydomonas reinhardtii* mutant T_{44} unable to synthesize and/or to integrate the Q_B protein of photosystem II at 37°C". *Biochim. Biophys. Acta* **849**, 41-50.
- Renger, G.** (1988) "The photosynthetic oxygen evolving complex: functional mechanism and structural organization". Dans: ISI Atlas of Science: Biochemistry. ISI Inc., New York (NY). 41-47.
- Renger, G. et Wolff, G.** (1977) "Further evidences for dissipative energy migration via triplet states in photosynthesis. The protective mechanism of carotenoids in *Rhodospseudomonas spheroides chromatophores*". *Biochim. Biophys. Acta* **460**, 47-57.
- Ridley, S.M.** (1977) "Interaction of chloroplasts with inhibitors. Induction of chlorosis by diuron during prolonged illumination in vitro". *Plant Physiol.* **59**, 724-732.
- Ridley, S.M. et Horton, P.** (1984) "DCMU-induced fluorescence changes and photo-destruction of pigments associated with an inhibition of PSI cyclic electron flow". *Z. Naturforsch.* **39C**, 351-353.
- Ried, A.** (1972) "Improved action spectra of light reaction I and II". Dans: Proceedings of the IInd International Congress on Photosynthesis, (Forti, G., Avron, M. et Melandri, A. édi.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague (Netherlands). pp. 763-772.
- Robinson, J.M.** (1988) "Does O_2 photoreduction occur within chloroplasts in vivo?". *Physiol. Plant.* **72**, 666-680.
- Ronen, R., Canaani, O., Garty, J., Cahen, D., Malkin, S. et Galun, M.** (1985) "Photosynthetic parameters in *Ramalina duriaei*, in vivo, studied by photoacoustics". Dans: Lichen Physiology and Cell Biology, (Brown, D.H. édi.). Plenum Publ. Corp., New York. 9-22.
- Rosencwaig, A. et Gersho, A.** (1976) "Theory of the photoacoustic effect with solids". *J. Appl. Phys.* **47**, 64-69.
- Rutherford, A.W.** (1989) "Photosystem II, the water-splitting enzyme". *Trends Biochem. Sci.* **14**, 227-232.
- Salin, M.L.** (1988) "Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast". *Physiol. Plant.* **72**, 681-689.

- Samson, G. et Fork, D.C.** (1991) *"Enhanced susceptibility of the oxidized and unprotonated forms of high potential cytochrome b_{559} towards DCMU"*. Photosynth. Res. **27**, 179-187.
- Samuelsson, G., Lönneborg, A., Rosenqvist, E., Gustafsson, P. et Oquist, G.** (1985) *"Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*"*. Plant Physiol. **79**, 992-995.
- Samuelsson, G., Lönneborg, A., Gustafsson, P. et Oquist, G.** (1987) *"The susceptibility of photosynthesis to photoinhibition and the capacity of recovery in high and low light grown cyanobacteria, *Anacystis nidulans*"*. Plant Physiol. **83**, 438-441.
- Satoh, K. et Fork, D.C.** (1982) *"Photoinhibition of reaction centers of photosystems I and II in intact *Bryopsis* chloroplasts under aerobic conditions"*. Plant Physiol. **70**, 1004-1008.
- Satter, R.L.** (1979) *"Leaf movements and tendril curling"*. Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Physiology of Movements (Haupt, W. et Feinleib, M.E. édi.). Vol. 7, Springer-Verlag, Berlin. 442-484.
- Sauer, K.** (1981) *"Charge separation in the light reactions of photosynthesis"*. Dans: Photosynthesis III (Akoyunoglou, G. ed.). Balaban International Science Service, Philadelphia (PA). 685-700.
- Scheibe, R.** (1990) *"Light/dark modulation: regulation of chloroplast metabolism in a new light"*. Bot. Acta **103**, 327-334.
- Scheller, H.V. et Möller, B.L.** (1990) *"Photosystem I polypeptides"*. Physiol. Plant. **78**, 484-494.
- Schönbohm, E.** (1987) *"Movement of Mougeotia chloroplasts under continuous weak and strong light"*. Acta Physiol. Plant. **9**, 109-135.
- Schreiber, U.** (1986) *"Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorimeter"*. Photosynth. Res. **9**, 261-272.
- Schreiber, U. et Berry, J.A.** (1977) *"Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus"*. Planta (Berl.) **136**, 233-238.
- Schreiber, U., Neubauer, C. et Klughammer, C.** (1989) *"Devices and methods for room-temperature fluorescence studies"*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **323**, 241-251.
- Schubert, W., Giani, D., Rongen, P., Krumbein, W.E. et Schmidt, W.** (1980) *"Photoacoustic in-vivo spectra of recent stromatolites"*. Naturwissenschaften **67**, 129-132.

- Schuster, G., Dewit, M., Staehelin, A.L. et Ohad, I. (1986) "Transient inactivation of the thylakoid photosystem II light harvesting protein kinase system and concomitant changes in intramembrane particle size during photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii*". J. Cell Biol. **103**, 71-80.
- Seely, G.R. et Connolly, J.S. (1986) "Fluorescence of photosynthetic pigments in vitro". Dans: Light Emission by Plants and Bacteria, (Govindjee, Ames, J. et Fork, D.C. édi.). Academic Press, Inc., New York (NY). 99-136.
- Seemann, J.R., Kobza, J. et Moore, B.D. (1990) "Metabolism of 2-carboxyarabinitol 1-phosphate and regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity". Photosynth. Res. **23**, 119-130.
- Snel, J.F.H., Kooijman, M. et Vredenberg, W.J. (1990 a) "Correlation between chlorophyll fluorescence and photoacoustic signal transients in spinach leaves". Photosynth. Res. **25**, 259-268.
- Snel, J.F.H., van Ieperen, W. et Vredenberg, W.J. (1990 b) "Complete suppression of oxygen evolution in open PS2 centers by non-photochemical quenching?". Dans: Current Research in Photosynthesis, Vol. II, (Baltscheffsky, M. édi.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. 911-914.
- Staehelin, L.A. et Arntzen, C. (1983) "Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components". J. Cell Biol. **103**, 1327-1337.
- Staehelin, L.A. et Allen, K.D. (1990) "Structural and biochemical studies of the macromolecular organization of chloroplast membranes". Dans: Structural and Organizational Aspects of Metabolic Regulation. Alan R. Liss, New York (NY). 113-127.
- Strand, M. et Oquist, G. (1985) "Inhibition of photosynthesis by freezing temperatures and high light levels in cold-acclimated seedlings of Scots pine (*Pinus sylvestris*). II. Effects on chlorophyll fluorescence at room temperature and 77 K". Physiol. Plant. **64**, 425-430.
- Styring, S., Virgin, I., Ehrenberg, A. et Andersson, B. (1990) "Strong light photoinhibition of electron transport in photosystem II. Impairment of the function of the first quinone acceptor Q_A ". Biochim. Biophys. Acta **1015**, 269-278.
- Szigeti, Z., Nagel, E.M., Buschmann, C. et Lichtenthaler, H.K. (1989) "In vivo photoacoustic spectra of herbicide-treated bean leaves". J. Plant Physiol. **134**, 104-109.
- Takahashi, M. et Asada, K. (1982) "Dependence of oxygen affinity for Mehler reaction on photochemical activity of chloroplast thylakoids". Plant Cell Physiol. **23**, 1457-1461.

- Terashima, I. et Saeki, T. (1983) "*Light environment within a leaf. I. Optical properties of leaf tissues of Camellia with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissue*". Plant Cell Physiol. **24**, 1493-1501.
- Terashima, I. et Inoue, Y. (1985) "*Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment*". Plant Cell Physiol. **26**, 781-785.
- Terashima, I., Sakagushi, S. et Hara, N. (1986) "*Intra-leaf and intracellular gradients in chloroplast ultrastructure of dorsiventral leaves illuminated from the adaxial or abaxial side during their development*". Plant Cell Physiol. **27**, 1023-1031.
- Thomas, H. et Matile, P. (1988) "*Photobleaching of chloroplast pigments in leaves of a non-yellowing mutant genotype of Festuca pratensis*". Phytochemistry **27**, 345-348.
- Thomasset, B., Thomasset, T., Barbotin, J.N. et Vejux, A. (1982) "*Photoacoustic spectroscopy of active immobilized chloroplast membranes*". Appl. Opt. **21**, 124-126.
- Thomasset, B., Barbotin, J.N., Thomas, D., Thomasset, T., Vejux, A. et Jeanfils, J. (1983) "*Fluorescence and photoacoustic spectroscopy of immobilized thylakoids*". Biotechnol. Bioeng. **25**, 2453-2468.
- Thornber, J.P. (1986) "*Biochemical characterization and structure of pigment proteins of photosynthetic organisms*". Dans: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Photosynthesis III. Vol 19. Springer-Verlag, Heidelberg. 98-119.
- Touloukian, Y.S. (1973) Thermophysical Properties of Matter V10: Thermal Diffusivity. IFI/Plenum, New York. 622-648.
- Trebst, A. (1980) "*Inhibitors in electron flow: Tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites*". Methods Enzymol. **69**, 675-721.
- Trewavas, A.J. (1992) "*What remains of the Cholodny-Went theory? Introduction*". Plant Cell Environ. **15**, 761.
- Tyndall, J. (1881) "*Action of an intermittent beam of radiant heat upon gaseous matter*". Proc. R. Soc. London **31**, 307-331.
- Tytler, E.M., Whitlam, G.C., Hipkins, M.F. et Codd, G.A. (1984) "*Photoinactivation of photosystem II during photoinhibition in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa*". Planta (Berl.) **160**, 229-234.
- Tyystarvi, E., Ovaska, J., Karunen, P. et Aro, E.-M. (1989) "*The nature of light-induced inhibition of photosystem II in pumpkin (Cucurbita pepo L.) leaves depends on temperature*". Plant Physiol. **91**, 1069-1074.
- Upadhyaya, V., Tawari, L.B. et Mishra, S.P. (1985) "*A study of the fluorescence quenching by photoacoustic spectrometry*". Spectrochim. Acta **41C**, 833-836.

- Vacek, K., Lokaj, P., Urbanová, M. et Sladký, P. (1979) "Radiative and nonradiative transitions in subchloroplast particules enriched in P-700". Biochim. Biophys. Acta 548, 341-347.
- van Rensen, J.J.S., Trebst, A. et Boger, P. (1984) "International workshop on the mode of action of herbicides in photosynthesis". Z. Naturforsch. 39c, 327-328.
- Vaughn, K.C. (1985) "Structural and cytochemical characterization of three specialized peroxisome types in soybean". Physiol. Plant. 64, 1-12.
- Veeranjaneyulu, K. et Das, V.S.R. (1982) "Photoacoustic spectroscopy- Leaf absorption spectra". J. Exp. Bot. 134, 515-519.
- Veeranjaneyulu, K. et Das, V.S.R. (1983) "Photoacoustic spectroscopy - leaf surface absorption spectra". J. Phys. (Coll C6) 44, 367-371.
- Veeranjaneyulu, K. et Das, V.S.R. (1985) "Purple pigmentation in leaves of some tropical weed species". Biol. Plant. (Praha) 26, 215-220.
- Veeranjaneyulu, K., Charland, M., Charlebois, D. et Leblanc, R.M. (1991 a) "Photoacoustic study of changes in the energy storage of photosystems I and II during state 1 - state 2 transitions". Plant Physiol. 97, 330-334.
- Veeranjaneyulu, K., Charland, M., Charlebois, D. et Leblanc, R.M. (1991 b) "Photosynthetic energy storage of photosystems I and II in the spectral range of photosynthetically active radiation in intact sugar maple leaves". Photosynth. Res. 30, 131-138.
- Veeranjaneyulu, K., Charlebois, D., N'soukpoé-Kossi, C.N. et Leblanc, R.M. (1990) "Effect of sulphur dioxide and sulfite on photochemical energy storage of isolated chloroplasts - a photoacoustic study". Environ. Pollut. 65, 127-139.
- Veeranjaneyulu, K., N'soukpoé-Kossi, C.N. et Leblanc, R.M. (1991) "Spectral efficiency of in vivo photochemical energy storage in SO₂ fumigated sugar maple leaves". J. Plant Physiol. 137, 459-464.
- Vogelmann, T.C. et Björn, L.O. (1986) "Plants as light traps". Physiol. Plant. 68, 704-708.
- von Caemmerer, S. et Farquhar, G.D. (1984) "Effects of partial defoliation, changes of irradiance during growth, short-term water stress and growth at enhanced p(CO₂) on the photosynthetic capacity of leaves of Phaseolus vulgaris L.". Planta (Berl.) 160, 320-329.
- Weil, J.H. (1987) "Organization and expression of the chloroplast genome". Plant Sci. 49, 149-157.

- Weis, E. et Berry, J.A. (1987) "*Quantum efficiency of photosystem II in relation to "energy dependent" quenching of chlorophyll fluorescence*". Biochim. Biophys. Acta **894**, 198-208.
- Went, F.W. (1928) "*Wuchsstoff und Wachstum*". Recueil Travaux Bot. Néerl. **15**, 1-116.
- Wettern, M. (1986) "*Localization of a 32 000 dalton chlorophyll protein pools in thylakoids: significance in atrazine binding*". Plant Sci. Lett. **43**, 173-177.
- Whitelam, G.C. et Codd, G.A. (1984) "*Photoinhibition of photosynthesis and in vivo chlorophyll fluorescence in the green algae Ankistrodesmus braunii*". Plant Cell Physiol. **25**, 465-471.
- Williams, W.P. et Allen, J.F. (1987) "*State 1/state 2 changes in higher plants and algae*". Photosynth. Res. **13**, 19-45.
- Winter, K. et Königer, M. (1989) "*Dithiothreitol, an inhibitor of violaxanthin de-epoxidation, increases the susceptibility of leaves of Nerium olander L. to photoinhibition of photosynthesis*". Planta (Berl.) **180**, 24-31.
- Wu, J., Neimanis, S. et Heber, U. (1991) "*Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition*". Bot. Acta **104**, 283-291.
- Yakir, D., Rudish, J. et Bravdo, B.A. (1985) "*Photoacoustic and fluorescence measurements of the chilling response and their relationship to carbon dioxide uptake in tomato plants*". Planta (Berl.) **164**, 345-353.
- Yakir, D., Rudish, J., Bravdo, B.A. et Malkin, S. (1986) "*Prolonged chilling under moderate light: effect on photosynthetic activity measured with the photoacoustic method*". Plant Cell Environ. **9**, 581-588.
- Yoda, K. (1974) (en japonais) Jpn. J. Ecol. **24**, 247-254.
- Zelitch, I. (1964) "*Organic acids and respiration in photosynthetic tissues*". Annu. Rev. Plant Physiol. **15**, 121-142.
- Zurzycki, J. (1972) "*Primary reactions in the chloroplast rearrangements*". Acta Protozool. **11**, 189-199.